VISIT…

LANZAROTE Caliente.COM

Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам

I

Редактор
О. МИКЕШ

В 2-х частях

Перевод с английского
канд. техн. наук
А. Ю. КОШЕВНИКА,

канд. физ.-мат. наук
С. А. ОРЛОВСКОГО

под редакцией и с послесловием
доктора хим. наук, профессора
В. Г. БЕРЕЗКИНА

Москва · Мир · 1982

LABORATORY HANDBOOK OF

CHROMATOGRAPHIC AND ALLIED METHODS

Chief Editor: O. MIKEŠ
Czechoslovak Academy of Sciences, Praque

Contributors: M. Hejtmánek, R. Komers, M. Krejči, B. Meloun, O. Mikeš, O. Motl, J. Novák, L. Novotný, Ž. Procházka, Z. Prusik, K. Šebesta, J. Štamberg, V. Tomášek, J. Turková

Translator: Ž. PROCHAZKA
Czechoslovak Academy of Sciences, Prague

Translation Editor: R. A. CHALMERS
University of Aberdeen

ELLIS HORWOOD LIMITED PUBLISHER

Chichester
Halsted Press: a division of

John Wiley & Sons
Chichester · New York · Brisbane · Toronto

Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам

I

Редактор
О. МИКЕШ

В 2-х частях

Перевод с английского
канд. техн. наук
А. Ю. КОШЕВНИКА,

канд. физ.-мат. наук
С. А. ОРЛОВСКОГО

под редакцией и с послесловием
доктора хим. наук, профессора
В. Г. БЕРЕЗКИНА

Москва · Мир · 1982

ББК 24.4
Л.12
УДК 543

Л.12 Авторы: **О. Микеш, Й. Новак, З. Прохазка, М. Гейтманек, К. Шебеста, В. Томашек, О. Мотл, Л. Новотный, Я. Штамберг**

Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам.

Пер. с англ./Под ред. О. Микеша.— М.: Мир, 1982.— Ч. 1—400 с., ил.

Книга написана чехословацкими специалистами, оригинальные исследования которых широко известны во всем мире. Это своего рода краткая энциклопедия по хроматографии. В ней рассматриваются все применяемые в настоящее время хроматографические методы анализа многокомпонентных смесей, излагается история каждого из методов, дается теоретическое их обоснование, описываются аппаратура и методика анализов, приводятся наглядные примеры.

В русском издании книга выходит в двух частях.

В первой части рассматриваются общая теория метода, жидкостная (колоночная), бумажная, ионообменная хроматография и гель-хроматография.

Для научных и инженерно-технических работников — химиков, биохимиков, медиков, биологов, фармацевтов.

Л $\frac{1805000000-038}{041(01)-82}$ 84-82, ч. 1

Редакция литературы по химии

© 1979 Otakar Mikeš/Ellis Horwood
© Перевод на русский язык, «Мир», 1982

Список обозначений

A — общая площадь поперечного сечения хроматографической колонки, перпендикулярного направлению течения подвижной фазы;

A_m, A_s, A_I — части площади поперечного сечения, занятые подвижной фазой (m), неподвижной фазой — сорбентом (s) и инертным носителем сорбента (I);

a_{im}, a_{is} — активности хроматографируемого растворенного вещества в подвижной фазе и в неподвижной фазе (сорбенте);

b — постоянная в уравнении (2.49);

c_i — общая концентрация растворенного вещества в хроматографической системе;

c_{im}, c_{is} — концентрации растворенного вещества в подвижной фазе и в неподвижной фазе (сорбенте);

$c_{im,0}$, $c_{im,L}$ — концентрации растворенного вещества в подвижной фазе на входе и на выходе из колонки;

D_m, D_s — коэффициенты диффузии растворенного вещества в подвижной фазе и в неподвижной фазе (сорбенте);

d_f — эффективная толщина пленки неподвижной жидкой фазы;

d_p — диаметр частиц, образующих хроматографический слой;

F_m — объемная скорость потока подвижной фазы;

f_{im}, f_{is} — летучесть растворенного вещества в подвижной фазе и в неподвижной фазе (сорбенте);

f^0_{im}, f^0_{is} — стандартная летучесть растворенного вещества в подвижной фазе и в неподвижной фазе (сорбенте);

G — постоянная в уравнении (2.49);

ΔG_s^0 — стандартная молярная свободная энергия сорбции Гиббса;

ΔG_s^0 (ГЖХ) — стандартная молярная свободная энергия сорбции Гиббса, характеризующая переход растворенного вещества из состояния чистого газа при давлении 1 атм и температуре системы в состояние чистой жидкости при давлении и температуре системы

ΔG_s^0 (ЖЖХ) — ΔG_s^0 (ЖЖХ) $= 0$;

ΔG_s^* (ЖЖХ) — стандартная молярная свободная энергия сорбции Гиббса, характеризующая переход растворенного вещества из состояния бесконечного разбавления в подвижной фазе в состояние бесконечного разбавления в неподвижной фазе (сорбенте) при давлении и температуре системы;

ΔG_s^* (ГЖХ) — стандартная молярная свободная энергия сорбции Гиббса, характеризующая переход растворенного вещества из состояния чистого газа при давлении 1 атм и температуре системы в состояние бесконечного разбавления в неподвижной фазе (сорбенте) при давлении и температуре системы;

ΔG^0_{cond} — $\Delta G^0_{cond} = \Delta G_s^0$ (ГЖХ);

H — высота, эквивалентная теоретической тарелке;

h_{im}, h_{is} — константы в уравнении закона Генри для растворенного вещества в подвижной фазе и в неподвижной фазе (сорбенте);

I — инертный носитель сорбента;

i — хроматографируемое вещество;

$J(dif, m)$, $J(dif, s)$ — потоки диффузии хроматографируемого вещества через воображаемые поперечные сечения в подвижной фазе и в неподвижной фазе (сорбенте);

$J(trans)$ — поток переноса (число молей на единицу времени) растворенного вещества через воображаемое поперечное сечение в подвижной фазе;

$J(m \rightleftarrows s)$ — поток растворенного вещества через границу раздела фаз в данном элементе объема системы

ΣJ — $\Sigma J = J(trans) + J(dif, m) + J(dif, s)$;

j — коэффициент сжимаемости Джеймса-Мартина;

K_D — константа распределения (коэффициент распределения) растворенного вещества;

K_0 — коэффициент проницаемости хроматографического слоя;

k — коэффициент емкости (коэффициент извлечения) растворенного вещества;

k_d — константа скорости десорбции (десорбция рассматривается как реакция первого порядка);

L — длина хроматографической колонки;

L_f — расстояние фронта растворителя на хроматограмме от уровня элюента (в плоскослойной хроматографии);

M_m, M_s — молекулярные массы подвижной фазы и неподвижной фазы (сорбента);

m — подвижная фаза;

N_i — количество молей растворенного вещества в системе;

N_{im}, N_{is} — количество молей растворенного вещества в подвижной фазе и в неподвижной фазе (сорбенте);

n — число теоретических тарелок колонки;

p — давление;

p_i, p_0 — давление на входе и на выходе из колонки;

$\bar{p}$ — среднее давление в колонке;

p_i^0 — давление насыщенного пара чистого растворенного вещества при температуре системы;

q — коэффициент, характеризующий геометрию неподвижной жидкой фазы;

R — газовая постоянная;

R, R_f — фактор запаздывания растворенного вещества;

r — радиус капилляра;

s — сорбент (неподвижная фаза);

T — абсолютная температура системы;

t — время;

t_{im}, t_{is} — среднее время, в течение которого молекула растворенного вещества находится соответственно в подвижной фазе и в неподвижной фазе (сорбенте);

t_M — мертвое время удерживания;
t_R — время удерживания хроматографируемого вещества;
u — скорость перемещения подвижной фазы;
u_i — скорость перемещения центра зоны растворенного вещества;
u_f — скорость перемещения фронта растворителя (в плоскослойной хроматографии);
$u(\overline{p})$ — скорость перемещения газа-носителя при среднем давлении ($\overline{p}$) и температуре колонки;
$u(p_0)$ — скорость перемещения газа-носителя при давлении на выходе из колонки (p_0) и при температуре колонки;
V_M — мертвый объем удерживания;
V_m — общий объем подвижной фазы в системе;
V_R — объем удерживания хроматографируемого вещества;
V_R' — приведенный объем удерживания хроматографируемого вещества ($V'_R = V_R - V_M$);
V_s — общий объем неподвижной фазы (сорбента) в системе;
v_m, v_s — молярные объемы подвижной фазы и неподвижной фазы (сорбента);
z — координата длины в направлении течения подвижной фазы в колонке;
x_{im}, x_{is} — молярные доли растворенного вещества в подвижной фазе и в неподвижной фазе (сорбенте);
RS — хроматографическое разрешение;
γ^*_{im}, γ^*_{is} — коэффициенты активности растворенного вещества в подвижной фазе и в неподвижной фазе (сорбенте), определенные относительно бесконечно разбавленного раствора этого вещества, принятого за начальное состояние;
γ^0_{im}, γ^0_{is} — коэффициенты активности растворенного вещества в подвижной фазе и в неподвижной фазе (сорбенте), определенные относительно чистого вещества, принятого за начальное состояние;
γ_m, γ_s — коэффициенты, характеризующие затрудненность продольной диффузии растворенного вещества в находящейся между

частицами подвижной фазе и в неподвижной фазе (сорбенте);

γ_m', γ_s' — коэффициенты, характеризующие затрудненность поперечной диффузии растворенного вещества в подвижной фазе, находящейся внутри частиц геля и в порах частиц неподвижной фазы (сорбента);

ε — общая пористость хроматографического слоя;

ε_0 — пористость хроматографического слоя, определенная с учетом только объема между частицами (внешняя пористость);

η — динамическая вязкость подвижной фазы;

$\varkappa$ — площадь поверхности раздела между подвижной фазой и неподвижной фазой (сорбентом), приходящаяся на единицу объема хроматографической системы;

λ — коэффициент вихревой диффузии;

ν_{im} — коэффициент летучести растворенного вещества в газовой фазе (в смеси с газом-носителем);

ξ — массовый коэффициент переноса растворенного вещества через поверхность раздела между подвижной фазой и неподвижной фазой (длина на единицу времени);

ρ_m, ρ_s — плотность подвижной фазы и неподвижной фазы (сорбента);

σ — стандартное отклонение зоны, характеристика ее ширины;

$\bar{\sigma}$ — среднее арифметическое стандартных отклонений зон двух растворенных веществ;

σ_L — стандартное отклонение зоны, выраженное в единицах длины;

σ_t — стандартное отклонение зоны, выраженное в единицах времени;

σ_v — стандартное отклонение зоны, выраженное в единицах объема;

$\sigma^2(A)$ — слагаемое дисперсии зоны*, обусловленное вихревой диффузией;

$\sigma^2(B_m)$, $\sigma^2(B_s)$ — слагаемые дисперсии зоны*, обусловленные продольной диффузией хроматогра-

* Все перечисленные слагаемые дисперсии зоны выражены в единицах длины во второй степени.

фируемого вещества в подвижной фазе и в неподвижной фазе (сорбенте);

$\sigma^2(C_m)$, $\sigma^2(C_m{}^*)$ — слагаемые дисперсии зоны*, обусловленные неравновесностью состава подвижной фазы, находящейся между частицами и внутри частиц;

$\sigma^2(C_{sa})$, $\sigma^2(C_{sl})$ — слагаемые дисперсии зоны*, обусловленные неравновесностью состава неподвижной фазы соответственно в адсорбционной хроматографии и в хроматографии на жидких сорбентах (распределительной хроматографии);

$\sigma^2(A, C_m)$ — слагаемое дисперсии зоны*, обусловленное совместным эффектом вихревой диффузии и неравновесности состава подвижной фазы между частицами;

$\Sigma\sigma^2{}_{(i)}$ — сумма отдельных слагаемых дисперсии зоны в данной хроматографической системе;

Φ_m, Φ_s — доли поперечного сечения хроматографической колонки, занятые подвижной фазой и неподвижной фазой (сорбентом);

$\Phi_{,n}$ — доля подвижной фазы, находящаяся в пространстве между частицами;

ω — коэффициент, характеризующий геометрическую структуру хроматографического слоя.

---

* Все перечисленные слагаемые дисперсии зоны выражены в единицах длины во второй степени.

Глава 1. Основные типы хроматографии

О. МИКЕШ

Институт органической химии и биохимии
Чехословацкой Академии наук, Прага

1.1. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ

Выделение индивидуальных химических соединений из смесей различного происхождения всегда было и остается одной из основных задач химии. Прежде чем начать подробное химическое исследование какого-либо вещества, необходимо, как правило, выделить его в возможно более чистом виде и в достаточном количестве. В природных условиях вещества находятся главным образом в смесях, а продукты синтеза и других химических реакций обычно также не получаются сразу в чистом виде. Исходные смеси веществ могут быть чрезвычайно сложными по составу. Поэтому разделение смесей на отдельные компоненты является для химика одной из наиболее привычных работ.

Таким образом, методы разделения имеют важное значение как в промышленности, так и в лабораторных работах препаративного и аналитического характера. Целые отрасли промышленности занимаются выделением в чистом виде какого-либо одного вещества из природных продуктов, как, например, производство сахара. Для изготовления многочисленных лекарственных средств также требуется выделить природные или синтетические продукты в чистом виде. При использовании многих методов анализа соответствующие измерения можно проводить лишь после того, как исследуемые смеси разделены на компоненты. В этой монографии мы ограничимся рассмотрением только лабораторных методов.

Имея в виду то значение, которое придается выделению отдельных веществ, не следует удивляться, что некоторые методы разделения известны с давних времен. Это прежде всего седиментация, осветление, осаждение, экстракция, фильтрация через адсорбент, кристаллизация и перегонка; все эти методы широко применялись алхимиками. Некоторые из перечисленных

методов значительно усовершенствовались; так, метод классической перегонки привел к созданию такого современного метода, как молекулярная перегонка. Однако большинство классических методов недостаточно эффективно для разделения сложных смесей природных веществ (например, смесей красителей, углеводородов, биополимеров, аминокислот, пептидов, нуклеозидов, нуклеотидов, антибиотиков и других биохимических продуктов) или продуктов синтеза и т. п.

Поэтому постоянно велись и ведутся поиски новых, более совершенных методов разделения. В частности, различная адсорбционная способность даже очень близких по структуре соединений используется в адсорбционной хроматографии. Методы противоточного распределения, бумажной и жидко-жидкостной хроматографии основаны на различной растворимости компонентов смесей в двух несмешивающихся жидкостях. Различная растворимость газов в соответствующей жидкости и различная сорбция их твердыми носителями использованы при разработке методов газовой хроматографии. Различие электрических зарядов или констант электролитической диссоциации позволило разработать методы электромиграции (электрофореза) и ионообменной хроматографии. Наконец, самое новое направление, в котором используются специфические биохимические взаимодействия, по-видимому, позволит проводить избирательное выделение веществ посредством аффинной хроматографии. В результате разработки каждого из перечисленных направлений были созданы современные специализированные методы разделения, и цель настоящей книги познакомить с ними читателя.

Трудно переоценить значение методов разделения. Без них немыслима работа в обширных отраслях химии. Например, если бы не существовало бумажной и ионообменной хроматографии и электрофореза, то химия белков и нуклеиновых кислот, химия протеинов и соответствующая область молекулярной биологии едва ли достигли бы современного уровня развития. Методы противоточного распределения очень облегчили изучение антибиотиков, полипептидов и других соединений, а также позволили разделить многочисленные синтетические смеси. Без адсорбционной хроматографии нельзя себе представить современную химию природных соединений (витаминов, терпенов, стероидных гормонов и т. д.). Газовая хроматография — один из методов контроля, наиболее широко применяемый в промышленном крупнотоннажном органическом синтезе. Современные методы разделения используются не только в препаративных, но и в аналитических целях, а также в промышленности. Все эти методы интенсивно развиваются. В настоящее время точность и скорость разделения методами газовой и жидкостной

хроматографии достигли такого уровня, который едва ли можно было себе представить лет десять назад. Например, применяя метод аффинной хроматографии, можно провести высокоспецифичное одностадийное выделение нужных веществ из очень сложных природных смесей.

КРАТКАЯ ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ РАЗДЕЛЕНИЯ

Ряд явлений, положенных в основу хроматографических методов, известен уже давно. Например, еще во времена Аристотеля морскую воду очищали с помощью некоторых видов почв. Также давно известно, что минеральные удобрения остаются в почве в течение длительного времени и лишь с трудом вымываются дождевой водой. Английские химики-почвенники Уэй [35] и Томпсон [30] изучали процессы удерживания в почве катионов из фильтрующихся сквозь нее растворов. В ходе исследований они открыли в 1850 г. основные законы ионного обмена, хотя и не представляли себе, насколько важны сделанные ими наблюдения. Ионный обмен на природных продуктах (главным образом, на минералах и почвах) был позднее подробно изучен, но серьезный интерес к этому процессу возник только после синтеза первого органического ионообменника (1935 г.). Адамс и Холмс [1], конденсируя фенолсульфоновые кислоты с формальдегидом, получили искусственные смолы, с участием которых в отличие от неорганических ионообменников возможен обмен в водных растворах не только катионов металлов, но и ионов водорода. После того как путем конденсации полиаминов с формальдегидом были получены анионообменники, определены условия, позволяющие удалять электролиты из водных растворов новым методом — *деионизацией,* а не перегонкой. По мере того как налаживалось получение анионо- и катионообменников, их все шире стали применять не только для ионного обмена, но и для хроматографического разделения, т. е. возникла *ионообменная хроматография.* Во время второй мировой войны и после нее ионообменники постоянно применялись в ядерных исследованиях, поскольку, как выяснилось, они позволяют добиться высокоэффективного разделения радиоактивных изотопов. Ионообменная хроматография входит также в число методов, обеспечивавших в последние два десятилетия столь быстрое развитие биохимии.

Еще в конце средних веков было известно, что некоторые вещества, например древесный уголь, могут обесцвечивать растворы; таким способом уже в XIX столетии очищали сок сахарной свеклы. Однако по-настоящему это явление было изучено только в конце XIX и в начале XX столетия. Американский

химик и геолог Дей (1895—1925 гг.), исследуя пробы нефти, разработал метод [9], который в настоящее время мы назвали бы «адсорбционным фронтальным анализом», а сам Дей назвал его методом «дробной диффузии». Он считал, что пробы нефти, отобранные из разных месторождений и с разных глубин, окрашены по-разному потому, что нефть фильтруется через слои различных пород, слагающих индивидуальные месторождения. Далее он показал в условиях лаборатории, как изменяется окраска нефти при медленном пропускании ее через трубки, заполненные различными образцами почв. В этих опытах он наблюдал фракционирование, подобное фракционированию при перегонке. При фильтрации сырой нефти через колонку, заполненную измельченной фуллеровой землей, первые фракции были похожи на легкие нефтяные погоны, а за ними следовали более тяжелые высококипящие фракции. Дей понимал, что разработанный им и его сотрудниками метод имеет не только препаративное, но и аналитическое значение, он считал, что со временем станет возможным полное фракционирование нефти.

Русский ботаник Цвет (1872—1919 гг.) изучал пигменты, полученные из хлоропластов. При фильтрации растворов пигментов в петролейном эфире через узкую стеклянную колонку, заполненную карбонатом кальция, он наблюдал разделение ис-

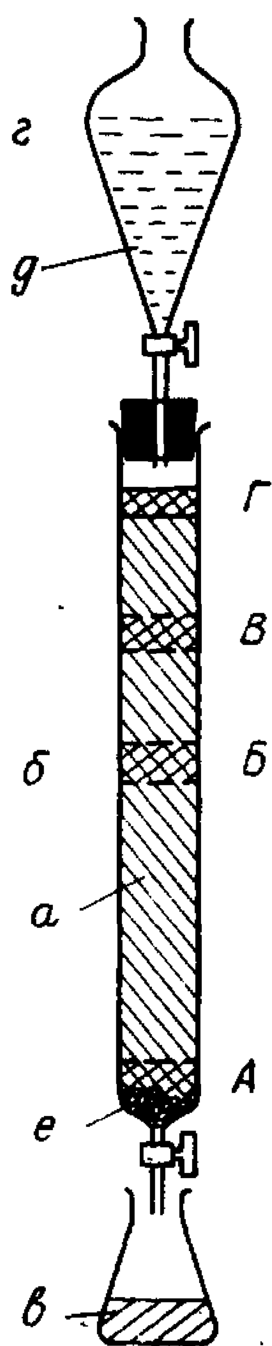


Рис. 1.1. Разделение методом адсорбционной хроматографии по Цвету.

а — адсорбент; *б* — колонка; *в* — элюат; *г* — делительная воронка; *д* — элюент; *е* — хлопковая вата.

Смесь веществ *А*, *Б* и *В*, первоначально адсорбированных в зоне *Г*, разделяется при элюировании соответствующим растворителем *д* (элюентом) на независимые зоны, движущиеся по направлению к выходу из колонки.

ходной смеси на окрашенные зоны в соответствии с эффективностью адсорбции пигментов на данном адсорбенте (рис. 1.1). Эти зоны перемещались в колонке с различными скоростями. Если затем вместо раствора смеси пигментов в колонку подавали только чистый растворитель, то зоны перемещались до тех пор, пока не завершалось их разделение. Цвет назвал этот метод *хроматографией,* хотя вполне сознавал, что таким способом можно разделять и бесцветные соединения. После разделения он или извлекал адсорбент из трубки, разрезал его на зоны и отдельно экстрагировал каждую зону или продолжал вводить растворитель, постепенно элюируя отдельные зоны из трубки, а потом выпаривал полученные растворы. Цвет описал применение этого метода более чем в пятидесяти статьях и суммировал весь свой огромный экспериментальный материал в большой монографии [34]. Эти публикации представляют собой классический пример научного открытия. Цвет впервые опубликовал результаты своих исследований в 1903 г. в Варшаве, а затем доложил их в 1906 г. Германскому ботаническому обществу. Удивительно, что этот высокоэффективный метод оставался в течение 25 лет забытым, хотя развивающаяся химия природных соединений крайне нуждалась в новых, лучших методах разделения. Дата возрождения этого метода приходится на 1931 г., когда Кун, Ледерер и Винтерштейн опубликовали свои работы по разделению каротиноидов [18, 19]. После этого хроматографические методы завоевали признание.

Начиная с 1940 г. Тизелиус [31, 32] и Классон [5] разрабатывали методику анализа, усматривающую непрерывное определение оптических свойств растворов, вытекающих из хроматографической колонки. В соответствии со способом выполнения

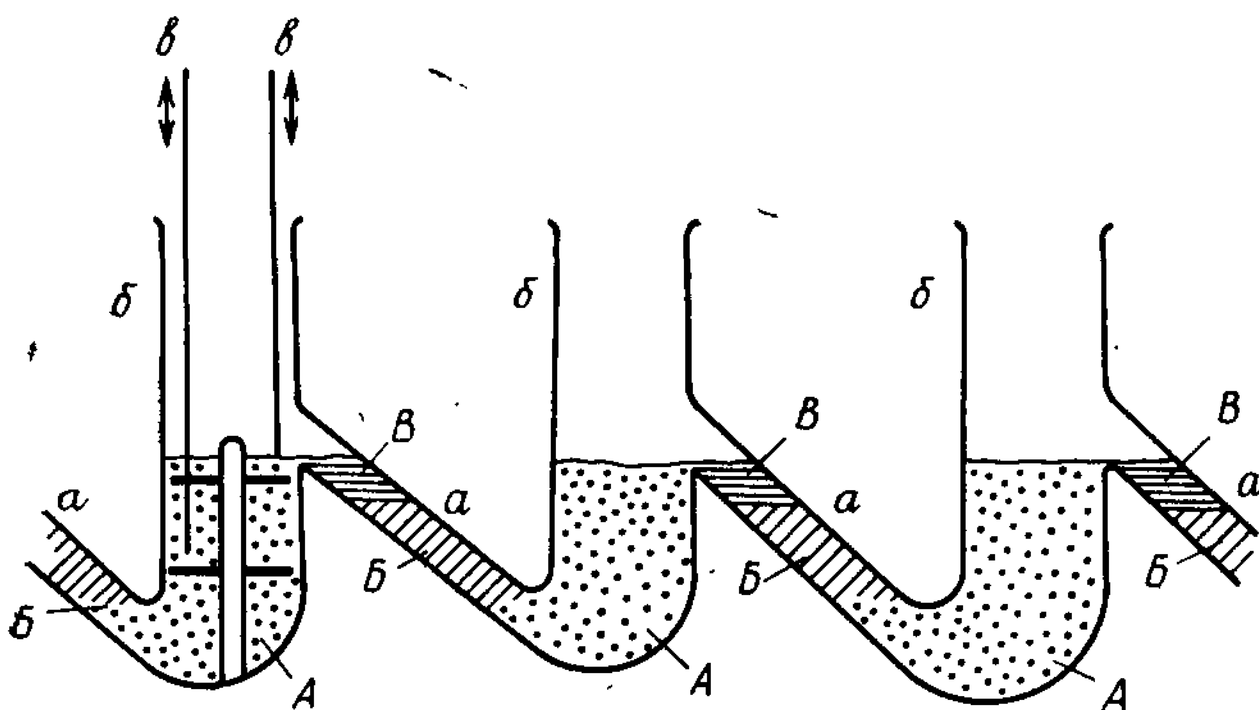


Рис. 1.2. Принцип экстракционной установки Мартина и Синджа [21].

а — отводы для расслаивания эмульсии *А*; *б* — сосуды для разделения фаз; *в* — вибрационные мешалки, помещенные в каждом сосуде. *Б* — хлороформная фаза, *В* — водная фаза. Установка состоит из сорока сосудов; смесь вводится в центральный сосуд, и перемещение обеих фаз совершается по принципу противотока.

и механизмом они разделили все хроматографические процессы на три группы: 1) *фронтальный анализ*; 2) *вытеснительная хроматография* и 3) *проявительная хроматография.*

В 1952 г. к совокупности уже известных методов колоночной хроматографии добавился такой важный метод, как *градиентное элюирование.*

В то время, когда Тизелиус начал систематическое изучение колоночной хроматографии, Синдж достиг успеха в опытах по выделению ацетилированных аминокислот из белковых гидролизатов путем проводившейся в воронках экстракции из водной фазы в органическую. Мартин и Синдж [21] сконструировали состоявшую из сорока сосудов экстракционную установку; разделение ацетилированных аминокислот достигалось благодаря различиям их констант распределения между противоточными фазами — водой и хлороформом (рис. 1.2). Обе фазы перемешивали с помощью вибратора. Однако в том же 1941 г. была опубликована работа, автор которой осуществил аналогичное разделение на колонке, заполненной частицами силикагеля (рис. 1.3). Частицы силикагеля могут удерживать значительное количество водной фазы, оставаясь сухими на ощупь и твердыми. Хлороформ (органическая фаза) протекал в колонке между ча-

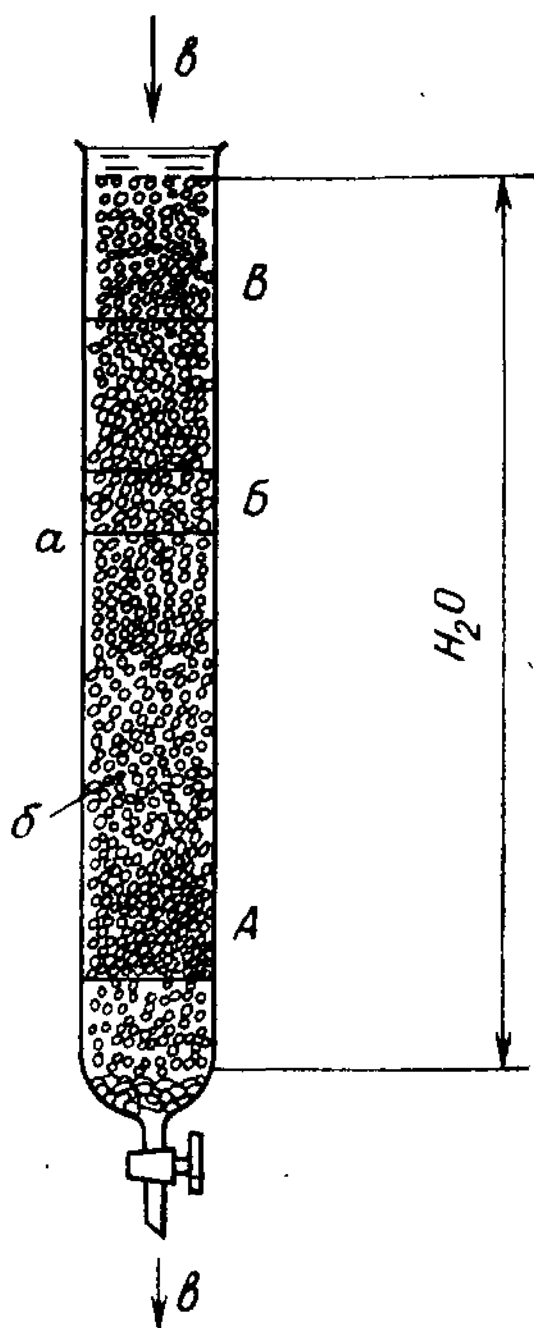


Рис. 1.3. Разделение методом распределительной хроматографии на колонке с силикагелем.

а — колонка; *б* — частицы силикагеля с закрепленной на них неподвижной водной фазой, соответствующие экстракционным сосудам на предыдущем рисунке. Раствор смеси ацетилированных аминокислот *А*, *Б* и *В* вводят в колонку сверху и элюируют потоком (*в*) хлороформа. В ходе элюирования компоненты смеси различным образом распределяются между текущей органической фазой и закрепленной на поверхности силикагеля водной фазой, и при этом постепенно происходит разделение смеси. Первой элюируется зона того вещества, которое в присутствии водной фазы лучше всего растворимо в хлороформе.

стицами. Таким образом, частицы силикагеля с закрепленной водной фазой выполняли ту же функцию, что и экстракционные сосуды в установке, описанной выше. Смесь ацетилированных аминокислот, введенная в колонку сверху, разделялась в соответствии с константами распределения* компонентов на фракции, т. е. в принципе такие же «зоны», которые получал Цвет при адсорбционном хроматографировании красителей. Так был открыт метод *распределительной хроматографии* (за его разработку Мартин и Синдж были удостоены в 1952 г. Нобелевской премии). Работы в этом направлении продолжались. В 1943 г. Мартин и Синдж [22] заменили силикагель на целлюлозу, что более удобно, так как отпадает необходимость в ацетилировании аминокислот. В следующем, 1944 г. Консден, Гордон и Мартин [6] применили в качестве носителя неподвижной жидкой фазы целлюлозу в виде фильтровальной бумаги

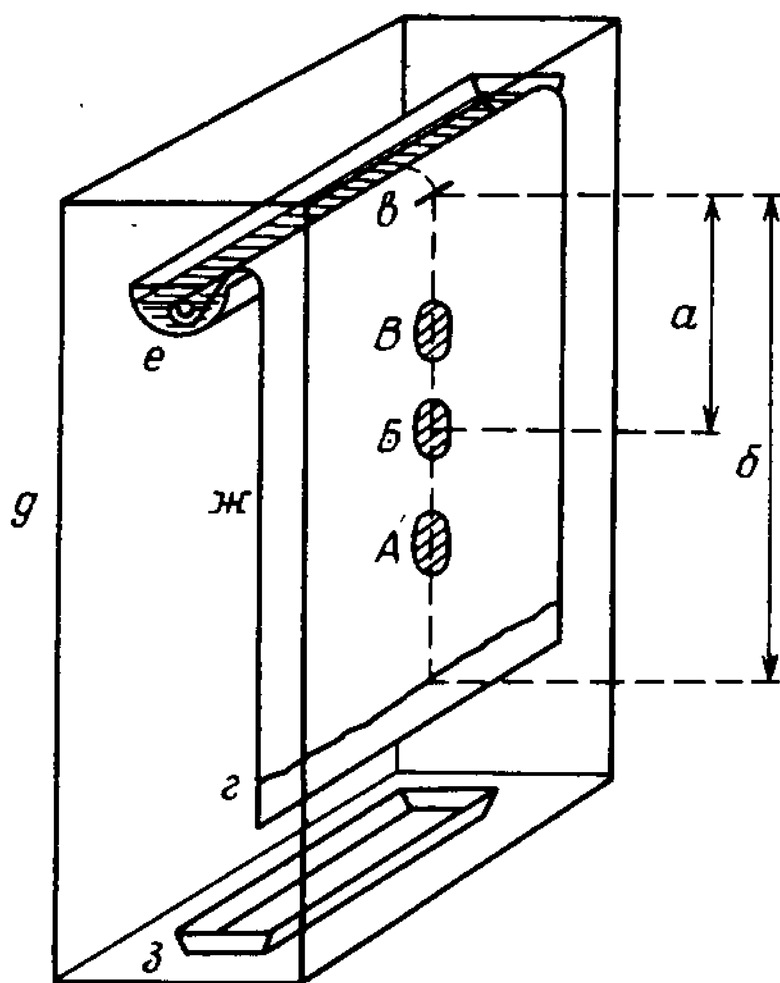


Рис. 1.4. Разделение методом бумажной хроматографии.

а — расстояние от стартовой линии *в* до движущегося вещества (в данном случае *Б*); *б* — расстояние от стартовой линии до фронта растворителя; *г* — положение фронта растворителя, движущегося вниз; *д* — герметически закрытая хроматографическая камера (обычно стеклянная); *е* — лоток, содержащий подвижную фазу; *ж* — фильтровальная бумага с неподвижной водной фазой (верхний край ее погружен в лоток *е*); *з* — сосуд с жидкостью, выполняющей роль неподвижной фазы, назначение которого — поддерживать необходимую влажность атмосферы в камере.

А, *Б*, *В* — положения компонентов смеси по окончании хроматографического разделения. Подвижная фаза впитывается в бумагу под действием капиллярных сил и переносит индивидуальные компоненты смеси с различными скоростями, зависящими от отношений растворимости этих компонентов в обеих фазах. Отношение $a/б = R_f$ (фактор запаздывания) остается в течение хроматографирования постоянным и характеризует данное разделяемое вещество.

* Термин «константа распределения» (distribution constant) используется вместо термина «коэффициент распределения» (partition coefficient), употреблявшегося в то время, когда был впервые предложен метод распределительной хроматографии.

(рис. 1.4) и испытали несколько растворителей в качестве подвижных фаз. Они сформулировали также принцип двумерной *бумажной хроматографии.*

История возникновения метода бумажной хроматографии служит отличным примером того, как систематическая целенаправленная работа позволяет перейти от исходных сложных систем к довольно простой и удобной методике, а именно по этой причине бумажная хроматография получила такое широкое распространение. История развития бумажной хроматографии весьма поучительна: она наглядно показывает, что разработать совершенные аппаратуру и методику можно только в том случае, когда до конца выяснен и теоретически обоснован принцип метода. Опыты по разделению на бумаге проводились задолго до описанных работ, а возможность частичного разделения красителей при капиллярном подъеме по бумаге была известна работавшим в области красителей химикам еще в XIX столетии. Однако только после разработки ясных теоретических представлений о механизме разделения метод был усовершенствован и получил широкое распространение.

Противоточная экстракция развивалась и в другом направлении, был разработан еще один метод разделения, и были сконструированы экстракционные колонки разных типов. Однако только в 1944 г. Крейг [7] разработал достаточно простую методику и такой прибор, которые позволяли получать точные, воспроизводимые и теоретически предсказуемые результаты. Этот метод, получивший название *противоточного распределения,* был принят во многих лабораториях как рутинный. Его распространению способствовала также публикация специальной монографии Геккера [12].

О том, что некоторые вещества способны адсорбировать газы, известно очень давно, а с 1936 г. это явление стало использоваться в газовой хроматографии. В 1952 г. Джеймс и Мартин [14] предложили метод *газо-жидкостной хроматографии,* а в 1953 г. чешский хроматографист Янак [15] внес существенный вклад в разработку *газо-твердофазной хроматографии.* В этом виде хроматографии смеси разделяются на длинных колонках, а составляющие их компоненты анализируются и определяются количественно с помощью специальных детекторов, сигналы которых регистрируются автоматически. Аналитические колонки помещаются в термостатируемые рубашки, температуру которых можно программировать. Приборы этого типа в настоящее время весьма необходимы во многих отраслях промышленности, поскольку позволяют оперативно контролировать качество получаемых продуктов.

В 1956 г. получила широкое распространение *тонкослойная хроматография,* в этом направлении очень много сделал Шталь:

он пропагандировал этот ранее описанный метод в многочисленных статьях и в своей монографии [28, 29]. В работах Шталя описывается хроматография на закрепленных слоях, а спустя всего четыре года стал применяться другой вариант этого метода — хроматография на незакрепленных слоях, т. е. не содержащих связующего. Современной тонкослойной хроматографии предшествовали более ранние варианты, первый из которых разработали Измайлов и Шрайбер [13] в 1938 г. Эти авторы проводили разделение на стеклянных пластинках, на которые они наносили слои оксида алюминия толщиной 2 мм, смешанного с водой в виде пасты. На этих слоях они анализировали методом круговой хроматографии экстракты растений, применяемые в медицине. Благодаря простоте метода и быстроте проведения эксперимента, тонкослойная хроматография во многих областях вытеснила бумажную, а также адсорбционную и ионообменную колоночную хроматографию.

В 1959 г. Порат и Флодин [23] предложили новый тип хроматографии — *гель-проникающую хроматографию*: анализируемые растворы медленно фильтруются через колонки, заполненные частицами соответствующего геля. Поэтому указанные авторы назвали свой метод *фильтрацией через гель*. В процессе разделения происходит как бы просеивание молекул, а разделение веществ совершается в соответствии с их молекулярными размерами. Поэтому данный метод имеет более или менее универсальный характер и применяется в очень многих целях. Широкая область применения этого метода обусловлена наличием в продаже большого выбора подходящих гелей. Один из вариантов этого метода используют для приближенного определения молекулярных масс разделенных веществ.

1967 г. отмечен появлением наиболее нового в настоящее время хроматографического метода — *аффинной хроматографии*. В этом году Порат, Аксен и Эрнбек [3, 24] смогли найти надежный способ фиксации аффинного лиганда (вещества, обладающего химическим сродством к выделяемому соединению) на соответствующем твердом носителе. Они разработали метод ковалентного связывания пептидных и белковых соединений на агарозе, активированной бромцианом, а также впервые описали опыты по выделению веществ этим методом. Благодаря рыхлой структуре агарозы на ней возможно взаимодействие даже больших молекул биополимеров, а из-за ее инертной природы на ней не происходит неспецифической сорбции, которая была бы нежелательна. Поэтому данный метод связывания использовался для изучения разделения на основе соответствующего взаимодействия между аффинным лигандом и выделяемым соединением. В 1962 г. Куатреказас, Уилчек и Энфинсен [8] назвали этот метод аффинной хроматографией. Подобно многим другим

методам разделения, у методов, основанных на специфическом биохимическом взаимодействии двух веществ, одно из которых химически связано с твердым носителем, также имеется ряд предшествующих вариантов. Первый из них был описан Кемпбеллом и др. [4]. При пропускании пробы через целлюлозу происходило связывание гаптенов (неполноценные антигены), и в результате достигалось специфическое удерживание антител этим сорбентом. Различные методы подобного рода использовались рядом других исследователей, но они не получили одобрения главным образом из-за наличия неспецифической адсорбции, обусловленной применением неподходящих носителей, или из-за уменьшения активности неправильно связанных лигандов. Только после того, как Порат и соавторы, а также Куатреказас и соавторы описали разработанную ими методику, число работ, в которых описывается разделение методом аффинной хроматографии, стало быстро расти.

Первая работа по *электрофорезу* была опубликована Лоджем в 1886 г. Он измерял скорость движения неорганических ионов под действием электрического тока в трубке, заполненной студнем агара [20]. Авторы ряда работ предложили много различных модификаций электрофоретического метода, свободного и с носителем, и описали методику разделения таким способом самых разных веществ. В 1937 г. Тизелиус [33] разработал такую методику свободного электрофоретического разделения веществ, прежде всего белков, которая стала впоследствии классической. Он не только удачно смонтировал электрофоретические ячейки, но и обеспечил регулирование в них температуры, а также (что еще важнее) использовал соответствующую оптическую систему для наблюдения за движением границ между разделяемыми веществами, что позволило непосредственно следить за ходом процесса разделения отдельных компонентов смеси и фотографировать его. В дальнейшем электрофоретический метод совершенствовался многими исследователями: они использовали более простые приспособления, главным образом с носителями, стабилизующими разделенные электрофорезом зоны. Очень важным шагом была разработка Ганнигом [11] метода непрерывного электрофореза без носителя, который в дальнейшем применяли для разделения не только макромолекул, но и клеточных частиц, бактериофагов и вирусов. В настоящее время разрабатывается еще один вариант электрофоретического разделения, основанный на принципе подвижной ионной границы — метод *изотахофореза*. Основы этого метода были изложены в 1923 г. Кендаллом и Криттенденом [16], но только публикация статей Константинова и Ошурковой в 1963 г. [17], и Мартина и Эверертса в 1970 г. [20а] открыла путь более широкому его применению.

1.2. КЛАССИФИКАЦИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В СООТВЕТСТВИИ С ПРИНЦИПОМ ПРОЦЕССА РАЗДЕЛЕНИЯ

Хроматографическое разделение в принципе возможно из-за неравномерного распределения компонентов смеси между неподвижной и подвижной фазами, обусловленного различным сродством отдельных компонентов к этим фазам или различной

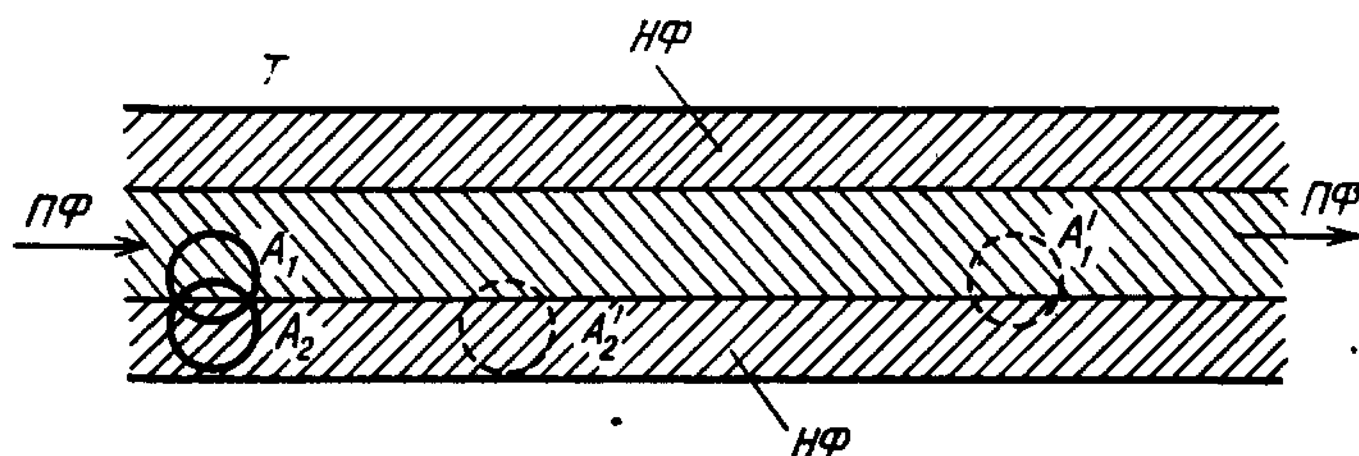


Рис. 1.5. Основной принцип хроматографического разделения.

НФ — слой неподвижной фазы, покрывающий внутреннюю поверхность капиллярной трубки *Т*, через которую течет подвижная фаза *ПФ*, находящаяся в равновесии с *НФ*. Компонент A_1 разделяемой смеси обладает бо́льшим сродством к подвижной фазе, а компонент A_2 — к неподвижной фазе. A'_1 и A'_2 — положения зон тех же компонентов через некоторый промежуток времени, в течение которого в капилляре совершалось хроматографическое течение в направлении, указанном стрелкой.

способностью к диффузии в этих фазах. Принцип этого явления схематически показан на рис. 1.5, где компоненты смеси A_1 и A_2 из-за различия свойств погружены в фазы ПФ и НФ на разную глубину. Благодаря тепловому движению молекулы разделяемых веществ A_1 и A_2 способны непрерывно проникать внутрь обеих фаз. Однако среднее время пребывания этих компонентов в указанных фазах различно, и, как следствие, в ходе данного динамического процесса компоненты смеси разделяются. Если молекулы вещества A_1 находятся преимущественно в подвижной фазе, то очевидно, что они ею переносятся в большей степени, чем молекулы компонента A_2, которые в среднем остаются на более длительное время связанными неподвижной фазой, и в итоге компоненты разделяются. Хроматографические методы сначала классифицировали в соответствии с принципами, лежащими в основе процессов разделения (табл. 1.1), и поэтому мы различаем типы хроматографии, описываемые в последующих разделах. Следует, однако, подчеркнуть, что на практике часто приходится иметь дело с такими методами, которые нельзя отнести к одной какой-либо группе. Поэтому предлагаемая классификация в известной степени условна, тем не менее мы воспользуемся этой классификацией и кратко охарактеризуем основные хроматографические методы.

Таблица 1.1

Классификация хроматографических методов в соответствии с принципом разделения

№ п/п	Наименование метода хроматографии	Природа основного процесса разделения	Величины, количественно определяющие степень сродства разделяемых веществ к фазам
1.	Адсорбционная	Адсорбция	Коэффициент адсорбции
2.	Распределительная	Экстракция	Константа распределения
3.	Ионообменная	Электростатическое взаимодействие и диффузия	Заряд, константа диссоциации и эффективный ионный диаметр
4.	Гель-хроматография	Диффузия	Эффективный молекулярный диаметр
5.	Аффинная	Биоспецифическое взаимодействие с аффинным лигандом	Общепринятая величина не выбрана[a]

[a] В специальных случаях такими величинами могут быть константа Михаэлиса (взаимодействие фермент — субстрат), константа ингибирования (взаимодействие ингибитора с ферментом), константа диссоциации (взаимодействие антител с антигенами) и т. п.

1.2.1. АДСОРБЦИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Концентрация отдельных компонентов смеси, растворенных в одной фазе, изменяется на границе раздела с другой фазой. На такой границе раздела часто происходит концентрирование растворенных компонентов. Это явление называется *адсорбцией*. Степень концентрирования отдельных компонентов пропорциональна их коэффициентам адсорбции. Различия в коэффициентах адсорбции определяют различия в концентрациях на границах раздела фаз, и если одна фаза перемещается относительно другой, то благодаря этим различиям может происходить хроматографическое разделение.

Наиболее давно известен и чаще всего применяется такой вариант адсорбционной хроматографии, в котором используется адсорбция на границе жидкой и твердой фаз. В стеклянной трубке находятся частицы твердого *адсорбента,* они обтекаются соответствующим растворителем, несущим в растворенном виде анализируемую смесь, а разделение компонентов происходит на поверхности адсорбента. Совершенно аналогичное разделение возможно также между газовой и твердой фазами. Здесь растворитель заменен на газ-носитель. Этот носитель переносит по колонке газообразную анализируемую смесь. В этом случае также играет роль различная величина адсорбции компонентов

на поверхности частиц. После разделения отдельные компоненты постепенно выходят из колонки.

Адсорбция и десорбция могут происходить и на поверхностях раздела между газовой и жидкой фазами. Если пузырьки газа проходят через жидкость, в которой растворены компоненты смеси, то на их поверхности раздела концентрируются компоненты с большой поверхностной активностью [25] и после оседания собранной пены их можно выделить. Этот метод называется *пенным анализом,* однако он не имеет большого практического значения.

Можно также проводить разделение смеси, используя адсорбцию на поверхности раздела двух соприкасающихся несмешивающихся жидкостей, но в этом случае определенную роль играют различия в растворимости компонентов в обеих фазах. Конечный результат определяется суммой указанных эффектов, и поэтому данный способ разделения целесообразнее причислить к методам распределительной хроматографии.

1.2.2. РАСПРЕДЕЛИТЕЛЬНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Смесь компонентов, растворенная в системе из двух несмешивающихся или частично смешивающихся жидких фаз, распределяется между ними в зависимости от растворимости индивидуальных компонентов в этих фазах или, точнее говоря, в соответствии с их сродством к этим фазам. Распределение компонентов определяется *константой распределения* K_D. Она представляет собой отношение равновесной концентрации данного компонента в неподвижной фазе к концентрации того же вещества в подвижной фазе, причем предполагается, что это вещество (компонент) находится в обеих фазах в одинаковом состоянии. Таким образом, эффективность разделения компонентов определяется тем, насколько различаются их константы распределения. Для того чтобы можно было использовать с целью хроматографического разделения систему из двух жидких фаз, необходимо, чтобы одна из фаз перемещалась относительно другой, а для этого необходимо иммобилизовать, т. е. прочно закрепить, одну из фаз: такая закрепленная жидкая фаза называется *неподвижной фазой.* Другая фаза должна медленно перемещаться вдоль поверхности раздела с первой, и она называется *подвижной фазой.* Обе эти фазы должны быть взаимно насыщены, т. е. приведены в равновесие, так как иначе в процессе хроматографического разделения возможно изменение концентрации компонентов самой растворяющей системы.

В распределительной хроматографии, как правило, используется система из двух фаз, причем одна фаза богаче органическим растворителем, а другая — водой. Водная фаза обычно за-

крепляется на твердых гидрофильных носителях, например силикагеле, диатомовой земле, крахмале, гидрофильных гелях, измельченной в порошок целлюлозе, фильтровальной бумаге. Органическая фаза обычно выполняет роль подвижной фазы. Однако в некоторых случаях целесообразнее насыщать органической фазой носитель, пропитанный гидрофобным веществом, а водную фазу использовать как подвижную. Такой способ разделения получил название *обращенно-фазной хроматографии,* и в определенных условиях он дает лучшее разделение.

Разделение методом распределительной хроматографии можно проводить также с помощью газовой и нелетучей жидкой фаз, если последняя закреплена на соответствующем твердом носителе. Здесь также используется различие в растворимости разделяемых компонентов в жидкой фазе. Менее растворимые или более летучие (при данной температуре) компоненты быстрее переносятся газом-носителем, благодаря чему и осуществляется их разделение.

1.2.3. ИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Двухфазную систему можно получить, приводя набухшие частицы ионообменника в соприкосновение с водным раствором смеси компонентов. Если разделяемые компоненты образуют в растворе ионы, то эти ионы электростатически взаимодействуют с ионогенными функциональными группами ионообменника, причем такие взаимодействия сопровождаются ионным обменом. Ионы с бо́льшим зарядом обладают бо́льшим сродством к ионообменнику, чем ионы с меньшим зарядом. Таким образом, характер ионообменного хроматографического разделения компонентов смеси зависит от разности зарядов этих компонентов. Средний заряд ионогенного компонента определяется зарядом иона и константой диссоциации ионогенной группы, а следовательно, и величиной pH среды. Первые две величины различны для индивидуальных компонентов смеси. Взаимодействие с функциональными группами ионообменника зависит от ионной силы раствора, а внутри частицы ионообменника оно лимитируется также возможностью диффузии ионов компонентов смеси внутрь частицы. Возможность же диффузии определяется плотностью геля, образующего ионообменник. Поскольку в данном случае эта плотность одинакова для всех компонентов, то различия в доступности функциональных групп ионообменника обусловлены только эффективными диаметрами гидратированных ионов.

Если компоненты различаются по зарядам их ионов, константам диссоциации ионогенных групп или по размерам ионов, то они характеризуются различным сродством к частицам ионо-

обменника. Для некоторых компонентов на это сродство влияет также различная степень их адсорбции на матрице ионообменной смолы. Все эти факторы оказывают влияние на изменяющуюся степень распределения компонентов между фазой ионообменного геля и фазой раствора. Если одна из этих фаз перемещается относительно другой, то при этом, как и в других типах хроматографии, компоненты смеси разделяются. Разделение описанным методом проводится в хроматографических колонках, заполненных достаточно тонко измельченным ионообменником, подвижной фазой служит вода.

1.2.4. ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИЯ

Очень часто компоненты анализируемой смеси значительно различаются по размерам молекул. Если раствор смеси этих компонентов соприкасается с твердой, но пористой фазой (поры которой заполнены тем же растворителем), то молекулы отдельных компонентов стремятся диффундировать из раствора внутрь твердой фазы. Однако, чтобы попасть внутрь твердой фазы, они должны пройти через отверстия пор. Поэтому, если выбрать твердую фазу с соответствующим размером пор, то можно полностью исключить диффузию больших молекул и замедлить диффузию средних. В такой двухфазной системе быстро достигается равновесие: малые молекулы беспрепятственно проникают внутрь пор и распределяются в обеих фазах, самые большие молекулы остаются только в жидкой фазе, а молекулы среднего размера частично проникают внутрь твердой фазы, но в основном остаются в жидкой фазе. В качестве пористой фазы целесообразнее всего пользоваться гелями.

В настоящее время в продаже имеются самые различные гели, их выпускают в виде сухих частиц, а используют после того, как гели набухнут в соответствующем растворителе. Этими частицами заполняют хроматографическую колонку, в которой они выполняют функцию неподвижной фазы. При медленной фильтрации раствора через колонку осуществляется относительное перемещение неподвижной и подвижной фаз. В результате неоднородного распределения молекул между фазами происходит постепенное разделение смеси на компоненты в соответствии с размерами молекул. Компонент с самыми большими молекулами, которые не входят в поры геля и поэтому переносятся без задержки растворителем, выходит из колонки первым. Движение молекул среднего размера, которые в результате диффузии могут частично проникать в неподвижную фазу, несколько замедленно. Малые молекулы свободно переносятся диффузией в поры геля, а их равновесное распределение сдвигается в сторону увеличения концентрации в фазе геля

по сравнению с другими молекулами, в результате молекулы малых размеров выходят из колонки последними.

В гель-хроматографии водных растворов чаще всего используют гидрофильные гели. Однако это не ограничивает область применимости метода. В некоторых случаях можно получить отличное разделение на гелях (например, каучука или слегка «сшитого» полистирола), способных набухать в органических растворителях, выполняющих роль подвижной фазы. При этом по описанному выше принципу совершается разделение гидрофобных веществ между набухшим гидрофобным гелем и растворителем.

1.2.5. АФФИННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Как уже говорилось в начале разд. 1.2, в основе различных хроматографических методов лежит различие в сродстве. В историческом введении (разд. 1.1) указывалось, что название «аффинная хроматография» было предложено для относительно нового и эффективного хроматографического метода, в котором сродство играет особенно важную роль. Это обстоятельство, а также отсутствие более подходящего названия привело к тому, что указанный термин быстро стал общепринятым*, хотя в принципе против применения здесь слова «хроматография» можно возражать. В ряде случаев аффинной хроматографией называют методику, в которой в действительности имеют место избирательная сорбция и десорбция**, а хроматографический процесс как таковой отсутствует (см. разд. 1.2). Этот пример не единичен. Ряд специальных методов разделения не укладывается в рамки общей схемы, и тем не менее их все-таки называют хроматографическими. Все сказанное подтверждает, что необходима простая и практическая терминология, пусть даже не идеально точная.

Описываемый метод основан на специфических взаимодействиях, характерных для некоторых биологических и биохимических процессов. Эти взаимодействия происходят между пáрами веществ, реагирующими в растворе с высокой избирательностью. Так, например, антитело и антиген специфически связываются друг с другом, фермент реагирует только со своим субстратом или с ингибитором, транспортная рибонуклеиновая кислота «выбирает» только ту аминокислоту, которую она может перенести внутрь рибосомы, эффектор реагирует с ферментом, действие которого он регулирует, а гормон реагирует с со-

* В последнее время применяется также более удачное наименование «биоаффинная хроматография».

** Для обозначения таких методов в настоящее время чаще используют термин «биоспецифическая сорбция и десорбция».

ответствующим рецептором и т. п. Если одно из соединений, относящееся к какой-либо из перечисленных пар, удерживается ковалентной связью на соответствующем носителе и если данное соединение сохраняет при этом свои специфические характеристики, то подобный десолюбилизованный препарат можно использовать для избирательного связывания из раствора второго соединения пары. Такой процесс можно проводить периодически, например перемешивая десолюбилизованный препарат (в форме частиц) с раствором смеси нескольких веществ. При этом препарат связывает только определенный компонент. Полученный препарат освобождают от сопутствующих соединений фильтрованием или центрифугированием (сделать это несложно), промывают и соответствующим образом выделяют необходимое соединение.

Если ввести десолюбилизованный препарат в хроматографическую колонку и медленно пропускать через нее раствор, то нужный компонент связывается и удерживается в колонке. После промывки колонки соответствующей десорбирующей жидкостью можно избирательно элюировать этот компонент. По своему аппаратурному оформлению и по методике весь этот процесс похож на другие методы колоночной хроматографии с неподвижной и подвижной фазами. Если при соответствующих условиях проводить сорбцию нескольких компонентов, которые избирательно взаимодействуют с десолюбилизованным препаратом, но различаются по сродству к нему, то мы будем иметь дело с действительно хроматографическим разделением. В процессе фильтрации эти компоненты разделяются по зонам и постепенно выходят из колонки вслед за несорбированными компонентами. Возможен и другой вариант метода: сорбируются все избирательно реагирующие компоненты, а их постепенное разделение происходит в процессе последующей десорбции. Этот процесс является действительно хроматографическим, если при прохождении смеси через колонку на десолюбилизованном препарате повторно достигается равновесие.

1.2.6. ДРУГИЕ ТИПЫ ХРОМАТОГРАФИИ

Некоторые специальные методы, основанные на принципах, отличающихся от указанных выше, также называются хроматографическими. Это, например, методы *исключения ионов, запаздывания ионов, электронного обмена* или *окислительно-восстановительной хроматографии, лигандной хроматографии* и *солюбилизационной хроматографии,* их мы рассмотрим в гл. 5 («Ионообменная хроматография»). Перечислим еще ряд методов хроматографического разделения. *Хроматография высаливания* и *хроматография связывания в соли,* где играет сущест-

венную роль влияние ионной силы на растворимость отдельных компонентов. *Осадочная хроматография* основывается на химической реакции, происходящей в ходе процесса разделения, причем дальнейшее разделение осуществляется на основе различной растворимости продуктов реакции. В методе *термохроматографии* для разделения используют температурный градиент. При разделении методом *реакционной,* или *ковалентной, хроматографии* в колонке происходит химическая реакция между одним из компонентов раствора и специальным носителем, и в результате этого данный компонент отделяется от других компонентов, элюируемых без удерживания. После элюирования этих компонентов удержанный компонент десорбируется посредством соответствующей химической реакции.

1.3. КЛАССИФИКАЦИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ПО СПОСОБУ РАЗДЕЛЕНИЯ

Хроматографическое разделение можно вести тремя принципиально отличающимися друг от друга способами. Хотя практическое значение их неодинаково, тем не менее мы рассмотрим все эти способы.

1.3.1. ФРОНТАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ

Фронтальный анализ предусматривает ввод в колонку раствора разделяемой смеси вплоть до окончания процесса. Например, если разделяется трехкомпонентная смесь (рис. 1.6), то сначала из колонки элюируется чистый растворитель, далее появляется и непрерывно элюируется из колонки компонент *А*; он обладает самым малым сродством к неподвижной фазе и поэтому слабее удерживается. Потом выходит смесь компонентов *А*+*Б* (*Б* обладает средним сродством), и в конце концов, когда неподвижная фаза насыщается компонентом *В*, обладающим наибольшим сродством к носителю, из колонки выходит раствор, содержащий смесь всех трех компонентов: *А*+*Б*+*В*; его состав тот же, что и состав исходного раствора, введенного в колонку. Этот метод называют *фронтальным анализом.* Если непрерывно измерять, например, коэффициент преломления элюата, то легко заметить, что коэффициент преломления резко возрастает в тот момент, когда в элюате появляется другой компонент. Для регистрации дифференциальной кривой, характеризующей эти изменения, пригоден любой подходящий оптический метод (рис. 1.6).

Очевидно, что фронтальный анализ непригоден для препаративных целей, поскольку в чистом виде удается выделить лишь часть одного компонента *А*. Этот способ разработан в ана-

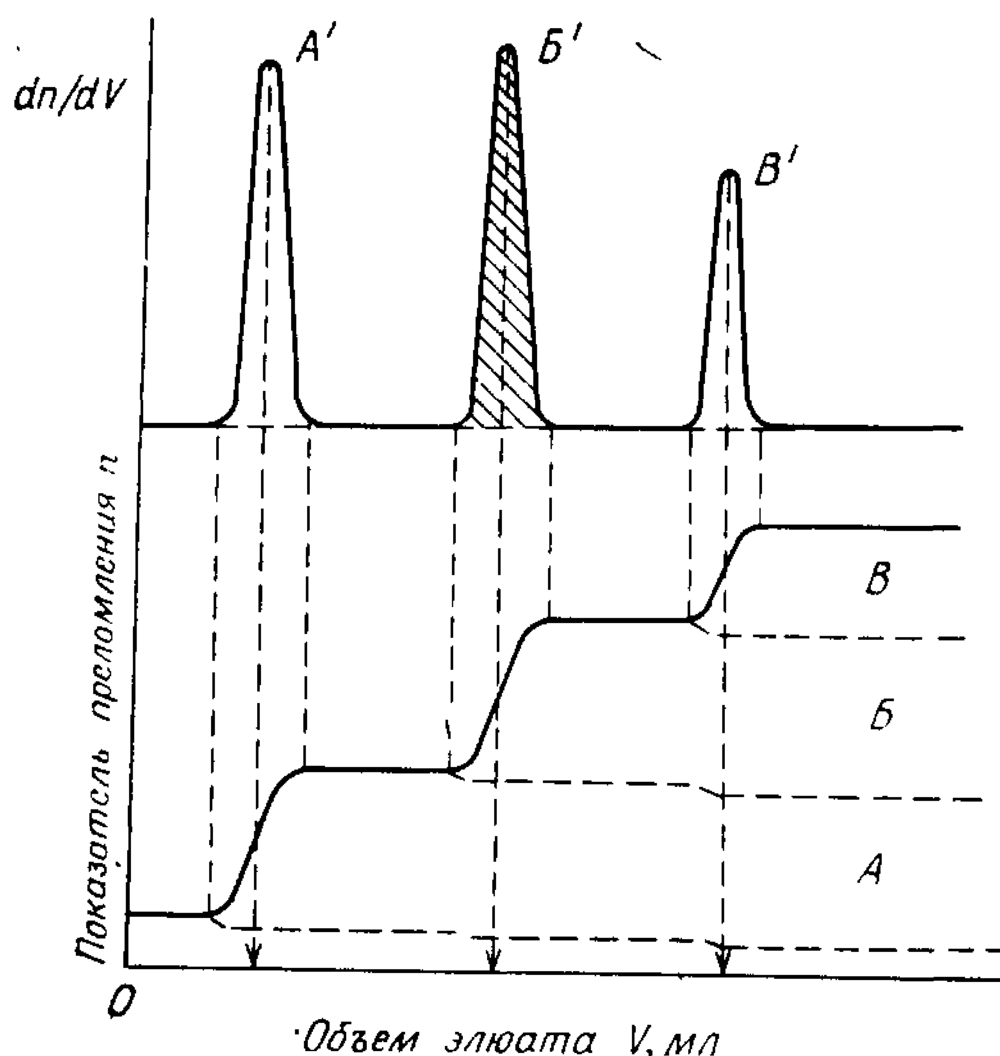


Рис. 1.6. Разделение методом фронтального анализа.

А, Б, В — компоненты смеси, перечисленные в порядке возрастания их сродства к неподвижной фазе. Сначала из колонки вытекает чистый растворитель, затем раствор *А*, потом раствор *А*+*Б* и, наконец, раствор *А*+*Б*+*В*. Пики *А'*, *Б'* и *В'* на дифференциальной кривой показывают, где начинается выход данного индивидуального компонента. По расстояниям пиков от начальной точки можно судить о природе компонентов (качественный анализ), а по площади пиков (заштрихована площадь пика *Б'*) можно рассчитать количество данного компонента (количественный анализ).

литических целях, для него необходима сложная оптическая аппаратура, и в первоначальном виде он больше не применяется. Однако он используется в настоящее время в специальных методах [24а].

1.3.2. ВЫТЕСНИТЕЛЬНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

В данном случае в колонку сначала вводят некоторое количество разделяемой смеси (например, смеси, содержащей в растворенном виде компоненты *А, Б* и *В*, как и в фронтальном анализе; см. разд. 1.3.1), а затем непрерывно подают раствор вещества *Г*, обладающего наибольшим сродством к неподвижной фазе. Это соединение — вытесняющий компонент — вытесняет все ранее удержанные неподвижной фазой компоненты и подобно поршню выталкивает их из колонки. По мере того как анализируемая смесь проходит через колонку, компоненты смеси вытесняют друг друга из неподвижной фазы в соответствии с их сродством к этой фазе. Процесс установления равновесия неподвижной фазой неоднократно повторяется, и в результате компоненты элюируются из колонки в последовательности *А, Б, В, Г* (рис. 1.7). Компонент с наименьшим сродством к непо-

движной фазе элюируется из колонки первым, а компонент *Г* — последним.

Этот метод, называемый *вытеснительной хроматографией*, не позволяет полностью разделить все компоненты смеси. Если один из компонентов должен освободить предыдущий компонент от взаимодействия с неподвижной фазой, то при этом все компоненты должны находиться в тесном контакте. Вследствие на-

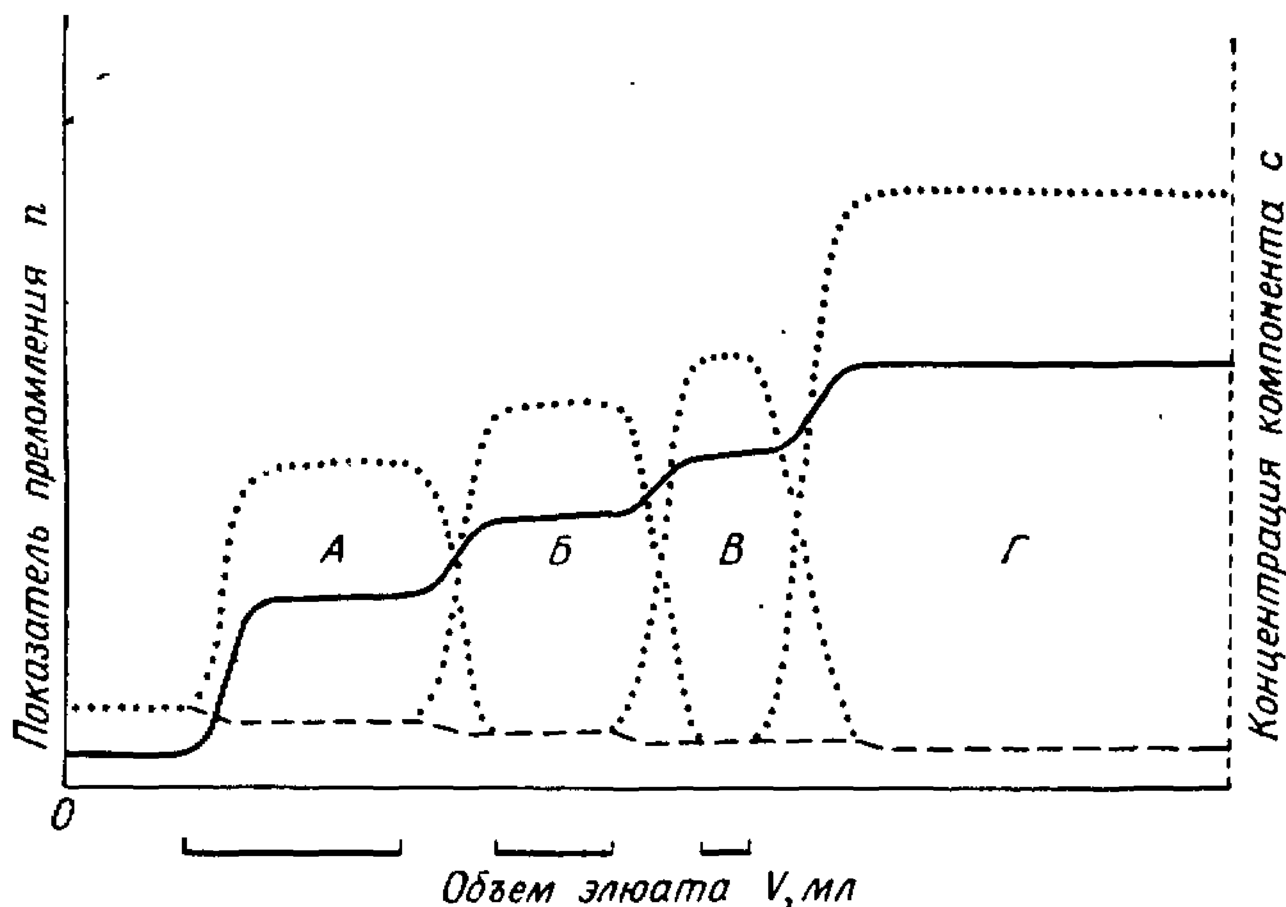


Рис. 1.7. Разделение методом вытеснительной хроматографии.
А, *Б*, *В* — компоненты смеси; *Г* — вытесняющий компонент. Квадратными скобками показана область чистого компонента.

рушения регулярного течения раствора через колонку, а также из-за того, что степень контакта не всегда одинакова, происходит частичное смешивание компонентов, и в результате они элюируются в такой последовательности: *А*, *А*+*Б*, *Б*, *Б*+*В*, *В*, *В*+*Г*, *Г*, т. е. наряду с чистыми компонентами из колонки выходят смеси, которые надо еще раз хроматографировать. По этой причине был разработан модифицированный вариант метода, названный *вытеснительной хроматографией с носителем*. В этом методе помимо основного вытеснителя в колонку вводят специально подобранные *дополнительные вытеснители* (*X*, *Y*, *Z*), которые по сродству к неподвижной фазе занимают промежуточное положение между каждыми двумя компонентами. Дополнительные вытеснители добавляют к смеси, которую надо разделить, и всю смесь целиком вводят в колонку, после чего добавляют реагент *Г*. Разделяемые вещества выходят из колонки в следующем порядке:

А, *А*+*X*, *X*, *X*+*Б*, *Б*, *Б*+*Y*, *Y*, *Y*+*В*, *В*, *В*+*Z*, *Z*, *Z*+*Г*, *Г*.

Дополнительные вытеснители надо подобрать так, чтобы в даль-

нейшем их можно было легко отделить от исходных разделяемых компонентов; например, это могут быть легколетучие соединения, которые легко можно отогнать или выпарить, с тем чтобы получить нужные компоненты *А, Б* и *В* в чистом виде. Этот вариант разделения пригоден только в тех случаях, когда мы достаточно хорошо знаем свойства разделяемых компонентов *А, Б* и *В*. Однако найти подходящие дополнительные вытеснители не всегда легко.

Вытеснительная хроматография имеет значение прежде всего как препаративный метод преимущественно в масштабе пилотных установок, потому что при ее применении пропускная способность колонки используется значительно лучше, чем в случае применения рассматриваемой в следующем разделе проявительной хроматографии. Однако она непригодна для аналитических целей.

1.3.3. ПРОЯВИТЕЛЬНАЯ (ЭЛЮЕНТНАЯ) ХРОМАТОГРАФИЯ

В этом методе в колонку вводят только небольшое количество раствора пробы (например, раствора смеси *А, Б, В*; см. разд. 1.3.1) и элюируют его растворителем *Г*, сродство которого к *неподвижной фазе* меньше, чем сродство любого из компонентов раствора. В результате многократного установления равновесия между фазами компоненты *А, Б* и *В* движутся вниз по колонке, продвижение их происходит очень медленно и требует затраты относительно большего количества растворителя (элюента). Однако таким методом можно элюировать каждый компонент независимо от других. Компоненты элюируются в порядке изменения их сродства, но их движение в колонке регулируется в основном только тройным взаимодействием в системе компонент — растворитель — неподвижная фаза. Поэтому зоны отдельных компонентов зачастую разделены при их движении в колонке зонами чистого растворителя, т. е. они не соприкасаются между собой. Компоненты выходят из колонки в виде полностью разделенных зон, часто называемых пиками (рис. 1.8), и не загрязнены другими компонентами. Поэтому проявительную хроматографию часто используют в аналитических, а также в препаративных целях, когда необходимо очень четкое разделение и можно не обращать внимание на низкую производительность колонки и большой расход растворителя.

Самым простым вариантом этого метода является *простое элюирование*, которое ведут одним и тем же растворителем вплоть до окончания процесса (рис. 1.8). Этот метод пригоден для разделения таких соединений, которые не слишком сильно различаются по сродству к неподвижной фазе, так что промежутки между зонами не чрезмерно велики. В противном случае

потребовалось бы очень много элюента для полного элюирования и последние компоненты образовали бы уширенные пики. Для разделения смесей компонентов, значительно отличающихся по сродству к неподвижной фазе, более пригодны другие методы, описываемые ниже.

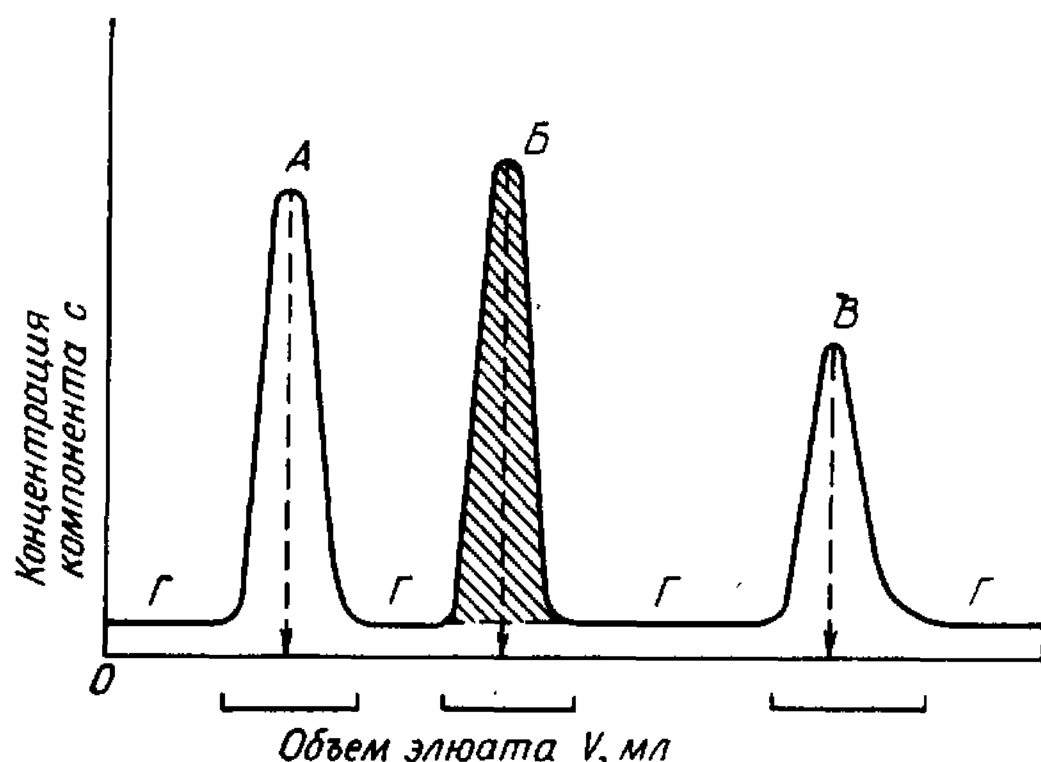


Рис. 1.8. Хроматограмма, полученная методом простой проявительной хроматографии.

А, Б, В — компоненты смеси, *Г* — элюент. Положение пиков показывает, в каком порядке элюируются компоненты, а площади их (заштрихована площадь пика *Б*) пропорциональны количеству компонента. Квадратные скобки показывают, как распределяются фракции.

Ступенчатое элюирование — последовательное элюирование смесями, элюирующая способность которых постепенно возрастает (рис. 1.9). При таком методе элюирования иногда два следующих один за другим растворителя элюируют один и тот же компонент в виде двух пиков, в результате может показаться, что в смеси содержатся два компонента, а не один. Кроме того, пики могут быть асимметричными с вытянутой нисходящей ветвью кривой, т. е. образуются *«хвосты»*. В этих и подобных им ситуациях целесообразнее пользоваться следующим методом разделения.

При *градиентном элюировании* осуществляется постепенное, а не дискретное изменение состава элюирующих растворителей. Два (рис. 1.10) или большее число растворителей постепенно смешиваются, и состав элюента, вводимого в колонку, постепенно изменяется в соответствии с количеством выходящей из колонки смеси. При этом нисходящая ветвь пика (*н*) всегда элюируется растворителем с несколько более высокой элюирующей способностью, чем растворитель, использованный для элюирования восходящей ветви пика (*в*). Таким образом достигается сужение зон и уменьшается возможность образования «хвостов». Применение градиентного элюирования обычно спо-

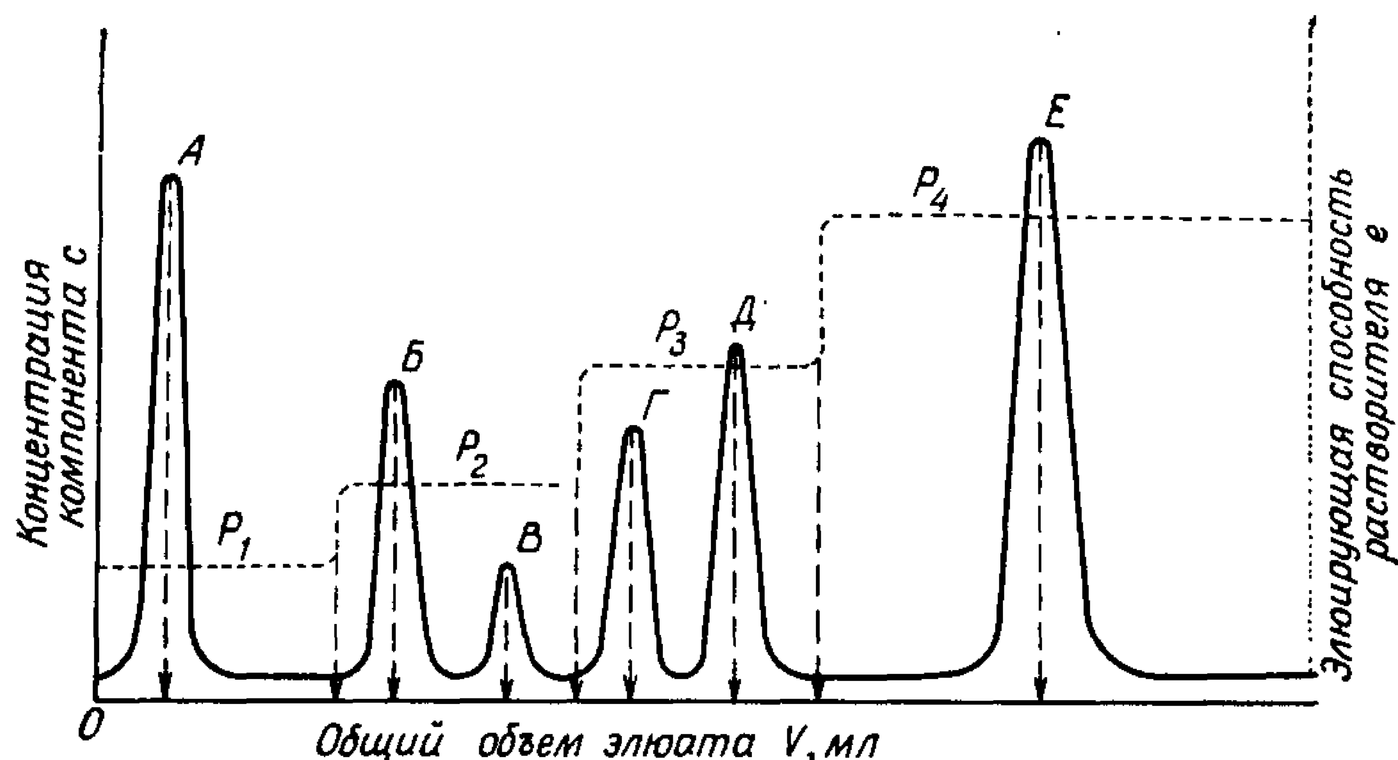


Рис. 1.9. Хроматограмма сложной смеси, разделенной ступенчатым элюированием.

е — элюирующая способность элюентов P_1—P_4 (пунктирная линия); *А*—*Е* — компоненты смеси.

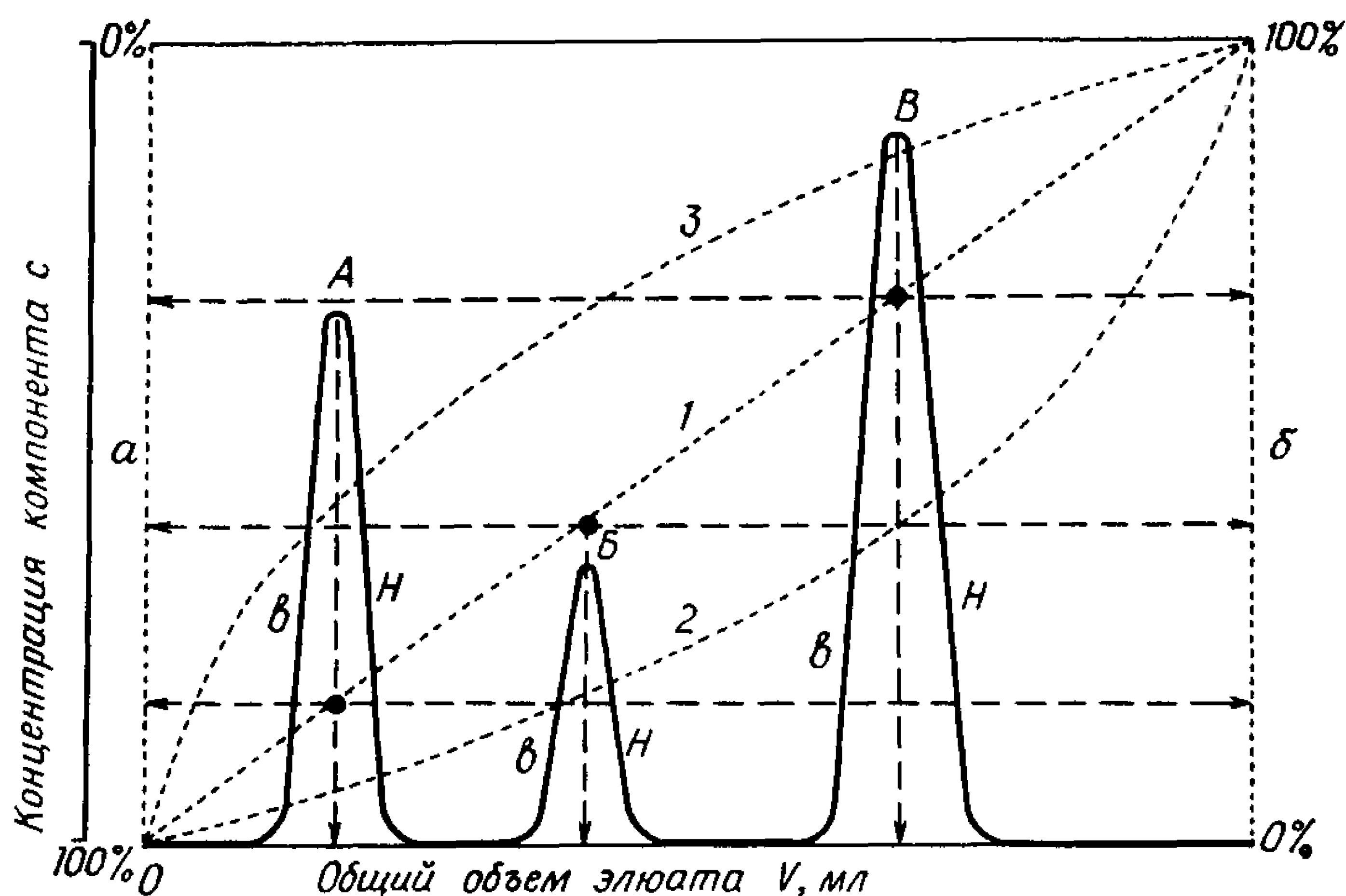


Рис. 1.10. Разделение методом градиентного элюирования.

А, *Б*, *В* — компоненты смеси; *а*, *б* — концентрации непрерывно смешиваемых элюентов с более низкой (*а*) и более высокой (*б*) элюирующей способностью в составе жидкости, поступающей в колонку.

1 — линейный градиент, *2* — постепенно возрастающий градиент (вогнутая кривая), *3* — постепенно убывающий градиент (выпуклая кривая), *в* — восходящая часть пика, *н* — нисходящая часть пика. Положения пиков зависят от состава элюирующего растворителя (здесь они показаны для элюирования с линейным градиентом).

собствует также улучшению разделения веществ, и поэтому данный метод широко используется в хроматографии. Постепенно менять состав элюента удобно, смешивая растворитель *б* с растворителем *а* в сообщающихся цилиндрических сосудах. Растворитель *а* вводят в колонку из сосуда, снабженного мешалкой

и называемого *смесителем*. Второй сосуд, в котором содержится растворитель *б*, называют *резервуаром*. Если оба сосуда имеют одинаковую емкость, то получается линейный градиент (прямая *1* на рис. 1.10). Если резервуар у́же смесителя, то получается непрерывно возрастающий градиент (кривая *2* на рис. 1.10), а если более узким является смеситель, то градиент непрерывно уменьшается (кривая *3*). Обычно для хроматографического разделения более выгоден линейный (*1*) или непрерывно возрастающий (*2*) градиент.

Можно задать градиент концентрации, полярности, ионной силы или pH. Чаще всего пользуются градиентом концентрации, но если элюирование ведется водными растворами, задают также градиенты ионной силы.

1.3.4. ДРУГИЕ ТИПЫ КЛАССИФИКАЦИИ ПО СПОСОБУ РАЗДЕЛЕНИЯ

Хроматографические методы можно также классифицировать в соответствии с типом применяемой аппаратуры. В рамках такой классификации мы различаем *колоночную хроматографию* (простую или с программированием температуры или давления), *капиллярную, тонкослойную* (на закрепленных слоях, содержащих связующее, или на незакрепленных, не содержащих связующее) или *плоскослойную хроматографию*. Если желательно подчеркнуть характер носителя неподвижной фазы, то различают *бумажную хроматографию, хроматографию на крахмале, целлюлозе* или *модифицированной целлюлозе, на полиамиде* и т. п.

В других случаях желательно подчеркнуть особый характер течения фаз. В *сухой колоночной хроматографии* элюент вводят в колонку, заполненную сухим адсорбентом. В *круговой хроматографии* стартовая линия пробы имеет форму окружности; элюент вводится в центр, и фронт растворителя движется радиально, образуя расширяющуюся окружность. Продвижение подвижной фазы можно ускорить, вращая хроматограмму в центрифуге (*центрифужная хроматография*). Препаративный вариант этого процесса проводится в цилиндрическом сегменте и носит название *радиальной хроматографии*. Аппарат для препаративной центрифужной радиальной хроматографии называется хроматоцентрифугой. *Хроматография на клиновидных полосках* представляет собой комбинацию круговой и линейной хроматографии: сначала используется принцип круговой хроматографии на круговом сегменте, чтобы расширить зоны в поперечном направлении и сузить в продольном, а дальнейшее разделение проводится при обычном линейном и параллельном перемещении растворителя.

1.4. СОВРЕМЕННАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ ТИПОВ ХРОМАТОГРАФИИ ПО ХАРАКТЕРУ ФАЗ, МЕЖДУ КОТОРЫМИ СОВЕРШАЕТСЯ ПРОЦЕСС ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ

В настоящее время известны хроматографические процессы, происходящие при участии жидкой и твердой фаз, газовой и твердой фаз, двух жидких фаз и газовой и жидкой фаз. Возможны и другие комбинации, но соответствующие процессы еще не разработаны и едва ли найдут практическое применение. Поэтому хроматографические методы делятся главным образом на две большие группы, названия которых соответствуют агрегатному состоянию подвижной фазы.

1.4.1. ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

В данном методе подвижная фаза представляет собой жидкость, а неподвижной фазой может быть твердое вещество или другая жидкость, не смешивающаяся или частично смешивающаяся с первой. Соответственно различают следующие варианты жидкостной хроматографии: 1) жидко-твердофазная и 2) жидко-жидкостная хроматография, где неподвижная жидкая фаза должна быть закреплена на соответствующем твердом носителе*.

1.4.2. ГАЗОВАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

В газовой хроматографии подвижной фазой является газ-носитель, а неподвижной фазой — твердое вещество или нелетучая жидкость. Газовая хроматография подразделяется на: 1) газо-твердофазную и 2) газо-жидкостную хроматографию.

Как и в предыдущем случае (см. разд. 1.4.1), нелетучая жидкость здесь также должна быть закреплена на соответствующем твердом носителе.

В последнее время химики чаще всего пользуются классификацией, изложенной в разд. 1.4. Объясняется это следующим: для каждой комбинации фаз применяется одинаковая или сходная аппаратура, независимо от типа хроматографического процесса (разделительная, ионообменная хроматография и т. д.). Менее важны также различия в принципе процесса разделения, и в данном конкретном способе разделения может использоваться более одного типа процесса. В табл. 1.2 показана взаимо-

* Это означает, что на практике, строго говоря, используется жидко-[жидко-твердо]фазная хроматография. Квадратными скобками выделена неподвижная фаза. — *Прим. ред.*

Таблица 1.2

Классификация хроматографических методов и их сокращенные обозначения

Классификация по агрегатным состояниям фаз		Классификация в соответствии с принципом процесса разделения		Классификация по характеру оформления метода	
тип хроматографии	сокращенное обозначение	тип хроматографии	сокращенное обозначение	тип хроматографии	сокращенное обозначение
Жидкостная	ЖХ(LCC)			Плоскослойная	ПСХ (FBC)
				Бумажная	БХ (PC)
				Тонкослойная	ТСХ (TLC)
				Высокоэффективная тонкослойная	ВЭТСХ (HPTLC)
				Колоночная	КЖХ (LCC)
				Жидкостная высокого давления	ЖХВД (HPLC)
				Высокоэффективная жидкостная	ВЭЖХ (HPLC)
Жидко-жидкостная[a]	ЖЖХ(LLC)	Распределительная			
		Обращенно-фазная	ОФХ(RPC)		
		Гель-проникающая	ГПХ(GPC)		
		Ионообменная	ИОХ(IEC)		
Жидко-твердофазная	ЖТХ(LSC)	Адсорбционная			
		Ионообменная	ИОХ(IEC)		
		Аффинная			
		Гидрофобная			
Газовая	ГХ(GC)			Колоночная	КХ (CC)
				Газовая с программированием температуры	ГХПТ (PTGC)
				Газовая с программированием давления	ГХПД (PPGC)
Газо-жидкостная[a]	ГХЖ(GLC)	Распределительная			
Газо-твердофазная	ГТХ(GSC)	Адсорбционная			

[a] Эти виды хроматографии, строго говоря, пока не реализованы. На практике используются следующие виды хроматографии (неподвижная фаза указана в квадратных скобках): жидко-[жидко-твердо]фазная и газо-[жидко-твердо]фазная. Подробнее см. в сб. *Березкин В. Г.*, Успехи хроматографии. Под ред. К. В. Чмутова и К. И. Сакодынского. — М.: Наука, 1972, с. 215.

связь между отдельными видами классификации и приведены сокращенные названия хроматографических методов.

Важно, однако, представлять себе, что в большинстве случаев классификация не является и не может быть абсолютно точной. Характер конкретного хроматографического процесса часто может быть очень сложным, и в нем могут использоваться несколько различных принципов. Поэтому точная классификация по схемам, приведенным в разд. 1.2—1.4, практически невозможна, впрочем, это и не обязательно. Важнее всего, чтобы разделение смеси на компоненты было как можно более эффективным.

1.5. ДРУГИЕ ТИПЫ КЛАССИФИКАЦИИ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

В зависимости от масштаба разделения мы различаем *аналитическую хроматографию* (качественную или количественную), когда работа ведется с малыми количествами веществ, и *препаративную хроматографию,* назначение которой — получение веществ, нужных для дальнейших лабораторных исследований. Кроме того, хроматографическое разделение может проводиться в *масштабе пилотных установок* и в *промышленном масштабе.*

Выше при описании различных методов предполагалось, что хроматография является периодическим процессом. Однако в настоящее время разработаны также методы непрерывной хроматографии. Такой процесс можно проводить, например, в системе, состоящей из вертикальных хроматографических колонок, укрепленных на боковой поверхности вращающегося цилиндра [27]. Сверху в колонки поступает элюент, он проходит через колонки и поступает в расположенные под ними сосуды. Через одно из загрузочных отверстий сверху непрерывно вводится раствор исходной пробы. В колонках проба при медленном вращении цилиндра разделяется на зоны и все зоны приобретают одинаковую горизонтальную составляющую скорости, зависящую от угловой скорости вращения. Кроме того, каждая зона перемещается в колонке со скоростью, направленной по вертикали, так что траектории зон образуют спирали различного наклона. При пересечении этих спиралей с нижним краем цилиндра каждое отдельное вещество (из различных колонок) всегда попадает в один и тот же сборный сосуд. Подобный принцип был также использован для разделения смеси на медленно вращающемся поставленном вертикально цилиндре из хроматографической бумаги с зубцами сверху и снизу [26]. Верхние зубцы отгибают к оси цилиндра и погружают в находящуюся там чашку с элюентом, который впитывается в бу-

магу и под действием капиллярных сил движется по ней вниз. У нижнего края цилиндра растворитель каплями стекает с кончиков зубцов в сборные пробирки. Пробу наносят с помощью капилляра на боковую поверхность у верхнего края цилиндра. Этот метод и подобные ему методы непрерывной хроматографии не имеют практического применения, они лишь демонстрируют возможность использования того или иного принципа.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Adams B. A., Holmes E. L.*, J. Soc. Chem. Ind., **54**, **1T** (1935); англ. пат. 450308 (1935).
2. *Alm R. S., Williams R. J. P., Tiselius A.*, Acta Chem. Scand., **6**, 826 (1952).
3. *Axen R., Porath J., Ernback S.*, Nature, **214**, 1302 (1967).
4. *Campbell D. H., Leuscher E. L., Lerman L. S.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **37**, 575 (1951).
5. *Claesson S.*, Arkiv Kemi, Mineral., Geol., **23A**, 1 (1946).
6. *Consden R., Gordon A. H., Martin A. J. P.*, Biochem. J., **38**, Proc. ix (1944).
7. *Craig L. C.*, J. Biol. Chem., **155**, 519 (1944).
8. *Cuatrecasas P., Wilchek M., Anfinsen C. B.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **61**, 636 (1968).
9. *Day D. T.*, Proc. Am. Phil. Soc., **36**, 112 (1897).
10. *Eucken A., Knick H.*, Brennstoff-Chem., **17**, 241 (1936).
11. *Hannig K.*, Z. Anal. Chem., **181**, 244 (1960).
12. *Hecker E.*, «Verteilungsverfahren im Laboratorium», Verlag Chemie, GmbH, Weinheim, 1955.
13. *Измайлов Н. А., Шрайбер М. С.*, Фармация, 1938, № 3, с. 1; Chem. Abstr., **34**, 855 (1940).
14. *James A. T., Martin A. J. P.*, Biochem. J., **46**, 679 (1952); Analyst, **77**, 915 (1952).
15. *Janák J.*, Collection Czech. Chem. Commun., **18**, 798 (1953).
16. *Kendall J., Crittenden E. D.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **9**, 75 (1923).
17. *Константинов Б. П., Ошуркова О. В.*, Докл. АН СССР, **148**, 1110 (1963).
18. *Kuhn R., Lederer E.*, Ber., **64**, 1349 (1931).
19. *Kuhn R., Winterstein A., Lederer E.*, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., **197**, 141 (1931).
20. *Lodge O.*, Brit. Ass. Adv. Aci. Rept., **56**, 389 (1886).
20a. *Martin A. J. P., Evaraerts F. M.*, Proc. Roy. Soc. Lond., **A316**, 493 (1970).
21. *Martin A. J. P., Synge R. L. M.*, Biochem., J., **35**, 91 (1941).
22. *Martin A. J. P., Synge R. L. M.*, Biochem. J., **37**, Proc. xiii (1943).
23. *Porath J., Flodin P.*, Nature, **183**, 1657 (1959).
24. *Porath J., Axén R., Ernback S.*, Nature, **215**, 1491 (1967).
24a. *Rezl V.*, Microchem. J., **15**, 381 (1970).
25. *Schütz F.*, Trans. Faraday Soc., **42**, 437 (1936).
26. *Solms J.*, Helv. Chim. Acta, **38**, 1127 (1955).
27. *Svensson H., Agrell C. E., Dehlén S. O., Hagdahl L.*, Science Tools, **2**, 17 (1955).
28. Хроматография в тонких слоях. Пер. с нем./Под ред. Э. Шталя. — М.: Мир, 1965.
29. *Stahl E., Schröter G., Kraft J., Renz R.*, Pharmazie, **11**, 633 (1956).
30. *Thompson H. S.*, J. Roy. Agr. Soc., **11**, 68 (1850).
31. *Tisellius A.*, Arkiv Kemi, Mineral., Geol., **14B**, 22 (1940).
32. *Tiselius A.*, «Les Prix Nobel en 1948», Stockholm, 1949.
33. *Tiselius A.*. Trans. Faraday Soc., **33**, 524 (1937): Biochem. J., **31**, 313 (1937); Kolloid Z., **85**, 129 (1938); Svensk. Kem. Tid., **50**, 58 (1938).
34. *Цвет М. С.*, Хромофилы в растительном и животном мире, Варшава, 1910.
35. *Way F. T.*, J. Roy. Agr. Soc., **11**, 313 (1850); **13**, 123 (1852).

Глава 2. Теория хроматографии

И. НОВАК

Институт аналитической химии Чехословацкой Академии наук, Брно

2.1. ВВЕДЕНИЕ

Хроматографию можно определить как процесс, во время которого хроматографируемое вещество перемещается в системе двух фаз, одна из которых неподвижная, а другая подвижная. Помимо проблем общего характера, мы рассмотрим в этой главе только проявительную хроматографию. При своем перемещении каждое хроматографируемое вещество постоянно перераспределяется между обеими фазами, так что только часть его движется вперед вместе с подвижной фазой. Отсюда следует, что скорость движения зоны этого вещества меньше, чем скорость движения подвижной фазы; при данной величине скорости движения подвижной фазы скорость движения зоны пропорциональна доле общего количества хроматографируемого вещества, находящейся в подвижной фазе. Эта доля зависит от константы распределения вещества в системе двух фаз; следовательно, в данной хроматографической системе зоны двух веществ с различными константами распределения должны перемещаться с различными скоростями. Поскольку в ходе перемещения обе зоны расширяются, то их нельзя разрешить, если разность констант распределения слишком мала.

Внедренный в хроматографическую систему растворенный компонент быстро распределяется между обеими фазами, и на какое-то время в системе устанавливается сорбционное равновесие. Однако движение подвижной фазы непрерывно нарушает его. Предположим, что растворенное вещество, содержащееся в определенной концентрации в неподвижной фазе, переносится из области, где эта его концентрация находится в равновесии с концентрацией в неподвижной фазе, в ту область, где концентрация его в неподвижной фазе меньше. В результате в передней части зоны концентрация растворенного вещества в подвижной фазе всегда выше равновесной концентрации, благодаря чему совершается переход растворенного вещества из

подвижной фазы в неподвижную, т. е. сорбция его. В задней части зоны создается обратное положение, поскольку смесь, первоначально находившаяся в равновесии с неподвижной фазой, замещается в подвижной фазе на смесь с меньшей концентрацией растворенного вещества, в результате чего вещество переходит из неподвижной фазы в подвижную, т. е. происходит десорбция. Следовательно, где-то в центре зоны не должно быть ни преимущественной адсорбции, ни преимущественной десорбции, т. е. здесь во все время перемещения зоны постоянно сохраняется состояние, близкое к равновесию. В последующих разделах мы проведем количественный анализ такой системы (все использованные нами буквенные обозначения даны в начале книги).

2.2. ОБЩЕЕ ОПИСАНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

2.2.1. МАТЕРИАЛЬНЫЙ БАЛАНС РАСТВОРЕННОГО ВЕЩЕСТВА В ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СИСТЕМЕ

Рассмотрим хроматографическую систему с определенным сочетанием фаз (ЖТХ, ЖЖХ, ГТХ, ГЖХ — см. табл. 1.2) и с любым их расположением (колонка или плоский слой), в которой течет подвижная фаза и перемещается зона растворенного вещества i. Предположим, что подвижная фаза и растворенное вещество перемещаются вдоль оси z (рис. 2.1). Представим себе в этой системе два поперечных сечения, проведенных перпендикулярно направлению течения, которые ограничивают элемент объема бесконечно малой толщины dz с площадью поперечного сечения A. В эту площадь входят площади, занятые подвижной фазой (A_m), неподвижным сорбентом (A_s) и неподвижным инертным носителем, если таковой имеется (A_I). Таким образом, $A=A_m+A_s+A_I$. Обозначим общую концентрацию растворенного вещества в системе c_i, а концентрации его в подвижной и неподвижной фазах соответственно через c_{im} и c_{is}. Все эти концентрации являются функциями времени t и положения z. Теперь рассмотрим величину $\partial N_i/\partial t$, характеризующую изменение во времени общего числа молей растворенного вещества в рассматриваемом элементе объема. Если c_i выражено в молях на единицу объема, а объем рассматриваемого элемента равен Adz, то

$$\partial N_i/\partial t = A(\partial c_i/\partial t)\,dz. \qquad (2.1)$$

Это изменение представляет собой разность между потоком растворенного вещества i, входящим в элемент объема через сече-

ние при z, и потоком его, выходящим через сечение, соответствующее $z+dz$ (оба потока выражены в молях на единицу объема). В подвижной фазе перенос растворенного вещества осу-

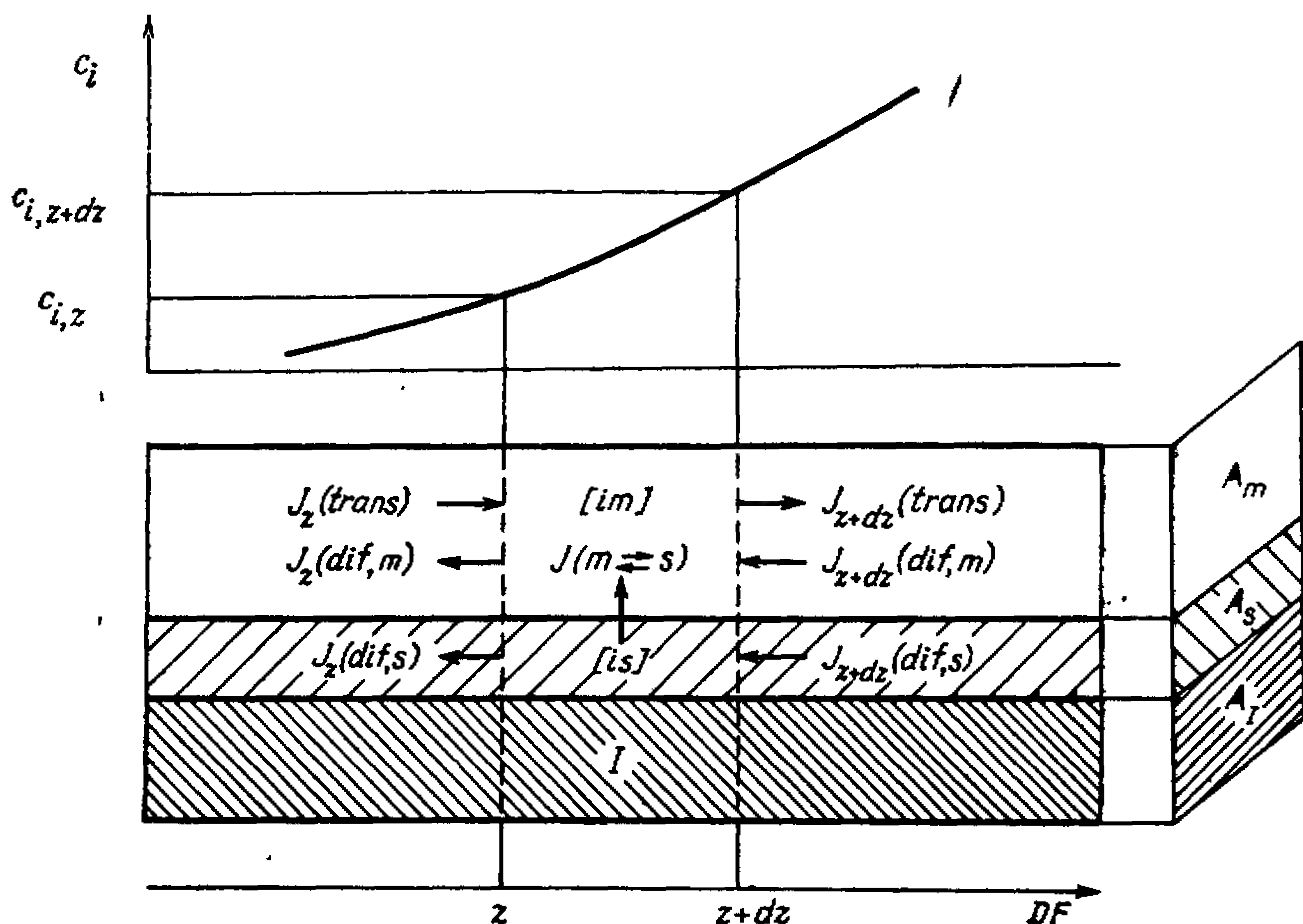


Рис. 2.1. Схема материального баланса растворенного компонента в воображаемом элементе объема хроматографической системы.

DF — направление течения подвижной фазы; c_i — общая концентрация растворенного компонента в системе; $c_{i,\,z+dz}$ и $c_{i,\,z}$ — концентрации в поперечных сечениях $z+dz$ и z, ограничивающих в хроматографической системе элемент объема бесконечно малой толщины. Оба поперечных сечения перпендикулярны направлению движения подвижной фазы, и их площади равны A. Эта площадь сечения слагается из площадей A_m, A_s и A_I, занятых соответственно подвижной фазой, сорбентом (неподвижной фазой) и инертной неподвижной подложкой сорбента. Символами $[im]$, $[is]$ и I обозначены соответственно растворенное вещество в подвижной фазе, растворенное вещество в неподвижной фазе и инертная подложка. $J(trans)$, $J(dif,\ m)$, $J(dif,\ s)$ — потоки массы растворенного вещества при движении через поперечные сечения с абсциссами z и $z+dz$ (как показывают индексы), совершающемся в результате перемещения подвижной фазы и продольной диффузии в ней и в сорбенте, а $J(m \rightleftarrows s)$ — поток массы растворенного вещества через границу раздела фаз в элементе объема (т. е. сорбционный поток).

ществляется как вследствие движения самой фазы, так и вследствие продольной диффузии, а в неподвижной фазе только в результате диффузии. Потоки, обусловленные движением фазы, описываются такими соотношениями (u — скорость движения подвижной фазы):

$$J_z(trans) = A_m u c_{im}, \tag{2.2}$$

$$J_{z+dz}(trans) = A_m u\,[c_{im} + (\partial c_{im}/\partial z)dz]. \tag{2.3}$$

Диффузионные потоки в подвижной фазе определяются из следующих уравнений:

$$J_z(dif,m) = -A_m D_m(\partial c_{im}/\partial z), \qquad (2.4)$$

$$J_{z+dz}(dif,m) = -A_m D_m[(\partial c_{im}/\partial z) + (\partial^2 c_{im}/\partial z^2)\,dz]. \qquad (2.5)$$

Для диффузионных потоков в неподвижной фазе применимы аналогичные выражения

$$J_z(dif,s) = -A_s D_s(\partial c_{is}/\partial z), \qquad (2.6)$$

$$J_{z+dz}(dif,s) = -A_s D_s[(\partial c_{is}/\partial z) + (\partial^2 c_{is}/\partial z^2)\,dz]. \qquad (2.7)$$

Таким образом, величину $\partial N_i/\partial t$, заданную уравнением (2.1), можно определить как

$$\partial N_i/\partial t = \Sigma J_z - \Sigma J_{z+dz}, \qquad (2.8)$$

что с учетом уравнений (2.2) и (2.7) дает

$$\partial N_i/\partial t = -A_m u(\partial c_{im}/\partial z)\partial z + A_m D_m(\partial^2 c_{im}/\partial z^2)\,dz + A_s D_s(\partial^2 c_{is}/\partial z^2)\,dz. \qquad (2.9)$$

Изменение числа молей $\partial N_i/\partial t$ слагается из изменений, происходящих в подвижной и неподвижной фазах, т. е.

$$A(\partial c_i/\partial t)\,dz = A_m(\partial c_{im}/\partial t)\,dz + A_s(\partial c_{is}/\partial t)\,dz. \qquad (2.10)$$

Решая совместно уравнения (2.9) и (2.10) и деля почленно на произведение Adz, получаем

$$\Phi_m(\partial c_{im}/\partial t) + \Phi_s(\partial c_{is}/\partial t) = -\Phi_m u(\partial c_{im}/\partial z) + \Phi_m D_m(\partial^2 c_{im}/\partial z^2) + \Phi_s D_s(\partial^2 c_{is}/\partial z^2), \qquad (2.11)$$

где Φ_m и Φ_s — доли поперечного сечения, занятые соответственно подвижной фазой и сорбентом (неподвижной фазой). Таким образом, уравнение (2.11) представляет собой уравнение материального баланса, отнесенное к единице объема системы. Если разделить все члены этого уравнения на Φ_m, то оно примет следующий вид:

$$\partial c_{im}/\partial t + (\Phi_s/\Phi_m)(\partial c_{is}/\partial t) = -u(\partial c_{im}/\partial z) + D_m(\partial^2 c_{im}/\partial z^2) + (\Phi_s/\Phi_m)D_s(\partial^2 c_{is}/\partial z^2). \qquad (2.12)$$

Очевидно, что отношение Φ_s/Φ_m тождественно отношению A_s/A_m, а величина Φ_m тождественна общей пористости ε, так что, например, для адсорбционной хроматографии (ЖТХ, ГТХ)

$$\Phi_s = 1 - \varepsilon \quad \text{и} \quad \Phi_s/\Phi_m = (1-\varepsilon)/\varepsilon.$$

Уравнение (2.12) содержит две неизвестные величины, c_{im} и c_{is}, поэтому для его решения необходимо еще одно независимое уравнение. Это уравнение можно получить, рассматривая

перенос массы растворенного вещества между двумя фазами. Такой перенос выражается потоком $J(m \rightleftarrows s)$, направление и плотность которого зависят от знака и величины отклонения от равновесия. Возможность переноса растворенного вещества из фазы *1* в фазу *2* обусловлена разностью между фактической концентрацией растворенного вещества в фазе *1* и такой концентрацией растворенного вещества в этой фазе, которая находилась бы в равновесии с концентрацией его в фазе *2*. Течение растворенного вещества через единицу поверхности раздела фаз задается выражением

$$\xi [c_{im} - (c_{is}/K_D)],$$

где ξ — коэффициент переноса растворенного вещества, а K_D определяется выражением

$$K_D = (c_{is}/c_{im})_{eq},$$

причем индекс eq означает, что c_{is} и c_{im} представляют собой равновесные концентрации. Если $\varkappa$ — площадь поверхности раздела фаз, приходящаяся на единицу объема хроматографической системы, то в нашем элементе объема Adz поток $J(m \rightleftarrows s)$ равен $\xi\varkappa[c_{im} - (c_{is}/K_D)]Adz$ молей в единицу времени и

$$A_s(\partial c_{is}/\partial t) = \xi\varkappa [c_{im} - (c_{is}/K_D)] Adz. \quad (2.13)$$

Поделив уравнение (2.13) почленно на Adz (т. е. также отнеся его к единице объема системы), можно придать ему вид, совместимый с уравнением (2.12):

$$\partial c_{is}/\partial t = \xi\varkappa [c_{im} - (c_{is}/K_D)]/\Phi_s. \quad (2.14)$$

В начальный момент в колонке растворенное вещество отсутствует, т. е.

$$c_{im} = c_{is} = 0 \quad \text{при} \quad 0 < z < \infty, \quad t = 0.$$

Вводят его в колонку в виде концентрационного импульса с концентрацией $c_{im,0}$, продолжительность которого равна δt, т. е.

$$c_{im} = 0 \quad \text{при} \quad t > \delta t, \quad z = 0;$$

$$c_{im} = c_{im,0} \quad \text{при} \quad 0 < t < \delta t, \quad z = 0.$$

Если в уравнении (2.12) пренебречь слагаемым $(\Phi_s/\Phi_m) D_s (\partial^2 c_{is}/\partial z^2)$, то система уравнений (2.12) и (2.14) имеет решение при указанных краевых условиях и некоторых дополнительных предположениях [5, 15], при $z = L$ (L — длина хроматографической колонки) это решение принимает следующий вид:

$$c_{im,L} = [N_i/\Phi_m A u \sigma_t \sqrt{2\pi}] \exp[-(t_R - t)^2/2\sigma_t^2]. \quad (2.15)$$

Такое решение имеет силу при условии, что $\delta t \ll t_R$. Время удерживания t_R и стандартное отклонение σ_t, которые входят в формулу (2.15), определяются приведенными ниже соотношениями:

$$t_R = L(1+k)/u, \qquad (2.16)$$

$$\sigma_t^2 = 2LD_m(1+k)^2/u^3 + 2L\Phi_m k^2/\xi \varkappa u, \qquad (2.17)$$

где k — так называемый коэффициент емкости*,

$$k = K_D\Phi_s/\Phi_m. \qquad (2.18)$$

Концентрационный профиль, описываемый уравнением (2.15), представлен схематически на рис. 2.2.

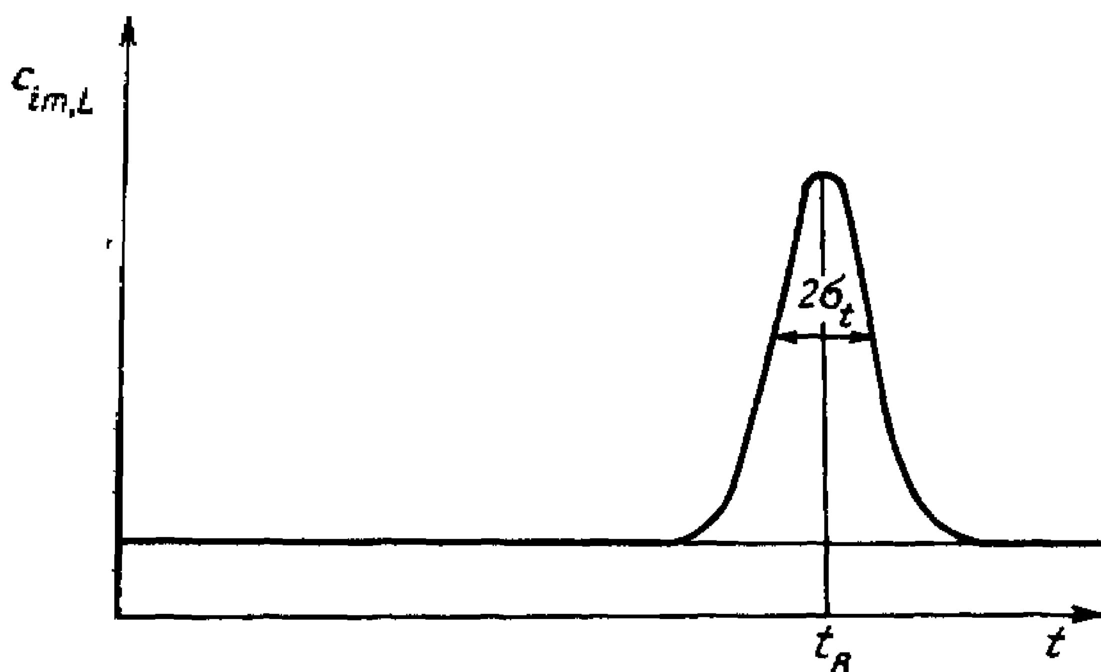


Рис. 2.2. Концентрационный профиль растворенного вещества в подвижной фазе у выхода из колонки.

t — время; t_R — время удерживания; σ_t — стандартное отклонение (полуширина пика на уровне точек перегиба), выраженное в единицах времени; $c_{im,L}$ — концентрация растворенного вещества в подвижной фазе у выхода из колонки на расстоянии L от стартовой линии хроматограммы.

Если влияние конечной величины скорости достижения равновесия пренебрежимо мало (т. е. если скорость движения подвижной фазы очень низка), то можно предположить, что равновесие существует на всей площади зоны, и решать уравнение (2.12), учитывая выражение, описывающее продольную диффузию в неподвижную фазу. В этом случае необходимо дополнить правую часть уравнения (2.17) для σ_t^2 выражением $2LD_s k(1+k)^2/u^3$.

Стандартное отклонение, выраженное в единицах длины (σ_L), и стандартное отклонение, выраженное в единицах време-

* В советской научной литературе k называют также коэффициентом извлечения. — *Прим. ред.*

ни (σ_t), связаны между собой соотношением

$$\sigma_L = \sigma_t u/(1+k), \qquad (2.19)$$

поэтому, решая совместно уравнения (2.17) и (2.19), можно получить уравнение

$$\sigma^2_L = 2LD_m/u + 2L\Phi_m k^2 u/\xi\varkappa(1+k)^2, \qquad (2.20)$$

которое при необходимости можно дополнить членом $2LD_s k/u$.

При выводе этих решений подразумевается, что u, c_{im} и c_{is} представляют собой величины, усредненные по всему поперечному сечению потока, что изотерма сорбции линейна и что все параметры, включая u, в уравнениях (2.12) и (2.14) постоянны вдоль пути перемещения вещества. Отсюда следует, что полученное решение в достаточной мере справедливо только для колоночных систем с несжимаемой подвижной фазой.

2.2.2. МОДЕЛЬ ИДЕАЛЬНОГО ЛИНЕЙНОГО ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

Представление об идеальном линейном хроматографическом процессе [20] выведено с использованием модели, обладающей следующими характеристиками: а) равновесное распределение растворенного вещества между обеими фазами достигается бесконечно быстро, б) коэффициенты продольной диффузии растворенного вещества в обеих фазах равны нулю, в) изотерма сорбции строго линейна и г) течение подвижной фазы подобно движению поршня. Хотя эта модель совершенно нереальна, она оказалась полезной, поскольку позволила получить в простой форме основную информацию относительно хроматографического удерживания.

В соответствии с перечисленными характеристиками модели D_m и D_s равны нулю, $c_{is} = K_D c_{im}$ в любой точке зоны, где величина K_D строго постоянна, а величина u абсолютно постоянна во всем поперечном сечении потока. При этом уравнение (2.12) принимает следующий вид:

$$\partial c_{im}/\partial t + (\Phi_s/\Phi_m)(\partial c_{is}/\partial t) = -u\partial c_{im}/\partial z, \qquad (2.21)$$

а вместо уравнения (2.14) получаем

$$\partial c_{is}/\partial t = K_D \partial c_{im}/\partial t. \qquad (2.22)$$

Решая совместно уравнения (2.21) и (2.22), получаем уравнение

$$(\partial c_{im}/\partial t)(1+k) = -u(\partial c_{im}/\partial z), \qquad (2.23)$$

которое по существу представляет собой математическое определение идеального линейного хроматографического процесса. Решение уравнения (2.23) приводит к основному уравнению

удерживания (2.16), которое мы получили для перемещения концентрационного максимума зоны, исходя из модели неидеального линейного хроматографического процесса. Конечно, анализ модели идеального линейного хроматографического процесса не дает никакой информации о расширении зоны, потому что в этой модели вообще не рассматриваются факторы, определяющие ее расширение; в условиях идеального линейного хроматографического процесса начальный профиль концентрации должен перемещаться, сохраняя свою форму, с такой же скоростью, с которой перемещается центр зоны в условиях неидеального хроматографического процесса (более строгий анализ [19] модели неидеального хроматографического процесса показывает, что величина времени удерживания не является полностью независимой от факторов, определяющих расширение зоны).

2.2.3. УРАВНЕНИЯ УДЕРЖИВАНИЯ

Основное уравнение (2.16), определяющее величину времени удерживания, можно выразить различным образом. Поскольку скорость перемещения максимума зоны u_i равна L/t_R, мы можем записать, что

$$u_i/u = 1/(1+k) = R, \tag{2.24}$$

где R — фактор запаздывания [16], который с известными оговорками равен величине R_f, используемой для выражения запаздывания в плоскослойных хроматографических системах. Отношение L/u представляет собой «мертвое» время запаздывания t_M, поэтому

$$t_R = t_M(1+k). \tag{2.25}$$

Умножая почленно это равенство на объемную скорость движения подвижной фазы (F_M), получаем следующее соотношение:

$$V_R = V_M(1+k), \tag{2.26}$$

в котором V_R и V_M — соответственно объем удерживания и «мертвый» объем подвижной фазы (подразумевается объем подвижной фазы в двухфазной системе). Поскольку $k = K_D\Phi_s/\Phi_m = K_DA_s/A_m$ и в однородной системе (колонке) $A_s/A_m = V_s/V_m$ (где $V_m = V_M$), то выражение (2.26) можно записать в таком виде:

$$V_R = V_M + K_DV_s. \tag{2.27}$$

Из этого уравнения следует, что

$$K_D = (V_R - V_M)/V_s = V'_R/V_s. \tag{2.28}$$

Объемы фаз (в частности, объем подвижной фазы в газовой хроматографии) зависят от давления и температуры, поэтому уравнения (2.16), (2.26)—(2.28) однозначны только при условии, что соответствующие скорости и объемы определены при температуре колонки и среднем давлении в ней. Более подробно этот вопрос рассматривается в разд. 2.4.

2.3. РАЦИОНАЛЬНОЕ ОПИСАНИЕ МОДЕЛИ НЕИДЕАЛЬНОГО ЛИНЕЙНОГО ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

В настоящее время точное решение для модели неидеального линейного хроматографического процесса не получено. Однако разработаны приближенные методы [7, 8], позволяющие охарактеризовать эту модель на основе анализа механизма хроматографического процесса. Этот подход весьма просто приводит к количественному определению понятия хроматографичеcкого удерживания и позволяет получить независимое описание индивидуальных факторов, определяющих расширение зоны, как функций физических свойств системы. Отношение скорости перемещения центра зоны к скорости движения всей подвижной фазы ($u_i/u=R$) определяется средней вероятностью наличия молекул растворенного вещества в подвижной фазе, т. е.

$$N_{im}/(N_{im}+N_{is})=t_{im}/(t_{im}+t_{is})=u_i/u=R. \qquad (2.29)$$

Поскольку $t_{im}+t_{is}=t_R$,

$$N_{is}/N_{im}=t_{is}/t_{im}=k \quad \text{и} \quad u_i=L/t_R,$$

то, следовательно, $t_R=L(1+k)/u$, т. е. опять получается основное уравнение удерживания (2.16).

2.3.1. РАСШИРЕНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ЗОНЫ

В этом разделе мы непосредственно рассмотрим выраженное в единицах длины стандартное отклонение [см. уравнение (2.19)] в качестве меры расширения зоны, причем ради краткости опустим индекс L в обозначении σ_L. Расширение зоны вызывается несколькими факторами, каждый из которых вносит определенный вклад в суммарное расширение. Теория показывает, что квадраты стандартных отклонений (т. е. величины дисперсии), соответствующие вызывающим расширение индивидуальным факторам, приближенно аддитивны [3], однако в ряде случаев некоторые факторы, вызывающие расширение зоны, зависят один от другого, так что характер суммирования соответствующих слагаемых дисперсии отличается от простого сло-

жения. Для достаточно подробного описания расширения зоны в общем случае неидеального линейного хроматографического процесса необходимо рассмотреть семь факторов, от которых зависит это расширение. Эти факторы: A — неоднородность течения подвижной фазы, B_m — продольная диффузия в подвижной фазе, B_s — продольная диффузия в неподвижной фазе, C_{sa} — неравновесность в неподвижной фазе при адсорбционной хроматографии, C_{sl} — неравновесность в неподвижной фазе при хроматографии с насадкой и жидким сорбентом, C_m — неравновесность в подвижной фазе, находящейся между частицами, и $C_m{}^*$ — неравновесность в подвижной фазе, находящейся внутри частиц, т. е. в их порах. Соответствующие слагаемые дисперсии, кроме последнего, можно описать следующими соотношениями (см. список обозначений, приведенный в начале книги):

$$\sigma^2(A) = 2\lambda d_p L, \tag{2.30}$$

$$\sigma^2(B_m) = 2\gamma_m D_m L/u, \tag{2.31}$$

$$\sigma^2(B_s) = 2\gamma_s D_s L(1-R)/Ru, \tag{2.32}$$

$$\sigma^2(C_{sa}) = 2R(1-R)\,Lu/k_d, \tag{2.33}$$

$$\sigma^2(C_{sl}) = qR(1-R)\,d_f^2 Lu/D_s, \tag{2.34}$$

$$\sigma^2(C_m) = \omega d^2{}_p Lu/2D_m. \tag{2.35}$$

Подвижная фаза внутри пор является застойной, так что вклад неравновесности этой части подвижной фазы в расширение зоны отличается от вклада, вносимого неравновесностью подвижной фазы, текущей в пространстве между частицами. Для частиц сферической формы справедливо такое соотношение [9], описывающее седьмое слагаемое дисперсии:

$$\sigma^2(C^*{}_m) = [(1-\Phi_m R)^2/30\gamma'{}_m(1-\Phi_m)]\,d^2{}_p Lu/D_m. \tag{2.36}$$

Относительный вклад каждого из отдельных факторов расширения зоны, а следовательно, и характер сочетания соответствующих дисперсий зависит от природы хроматографической системы. Влияние неоднородности течения подвижной фазы и влияние неравновесности в текущей подвижной фазе в какой-то степени компенсируют друг друга, так что результирующее слагаемое дисперсии, обусловленное этими двумя факторами, $\sigma^2(A, C_m)$ определяется с помощью следующего соотношения [10]:

$$\sigma^2(A, C_m) = 1/[1/\sigma^2(A) + 1/\sigma^2(C_m)]. \tag{2.37}$$

При возрастании скорости течения подвижной фазы величина $\sigma^2(A, C_m)$ принимает постоянное значение, т. е. стремится к $\sigma^2(A)$.

В хроматографическом процессе с жидким сорбентом, закрепленным на твердой подложке, суммарную дисперсию $\Sigma\sigma^2(i)$ можно выразить как

$$\Sigma\sigma^2(i) = \sigma^2(A, C_m) + \sigma^2(B_m) + \sigma^2(B_s) + \sigma^2(C_{sl}) + \sigma^2(C^*_m). \quad (2.38)$$

Если используется макропористая или совсем непористая подложка или если жидкий сорбент отлагается на микропористой подложке таким образом, что он целиком заполняет поры этой подложки, слагаемое $\sigma^2(C_m^*)$ отпадает. Если жидкий сорбент образует на подложке однородную пленку, q в уравнении (2.34) для слагаемого $\sigma^2(C_{sl})$ равно 2/3. Для микропористой подложки с порами, целиком занятыми жидким сорбентом, $\sigma^2(C_{sl})$ дается выражением $[R(1-R)/30\gamma_s']d_p^2Lu/D_s$, т. е. $q = 1/30\gamma_s'$ и $d_f = d_p$. Описание случая, когда поры микропористой подложки целиком заполнены сорбентом, применимо также и

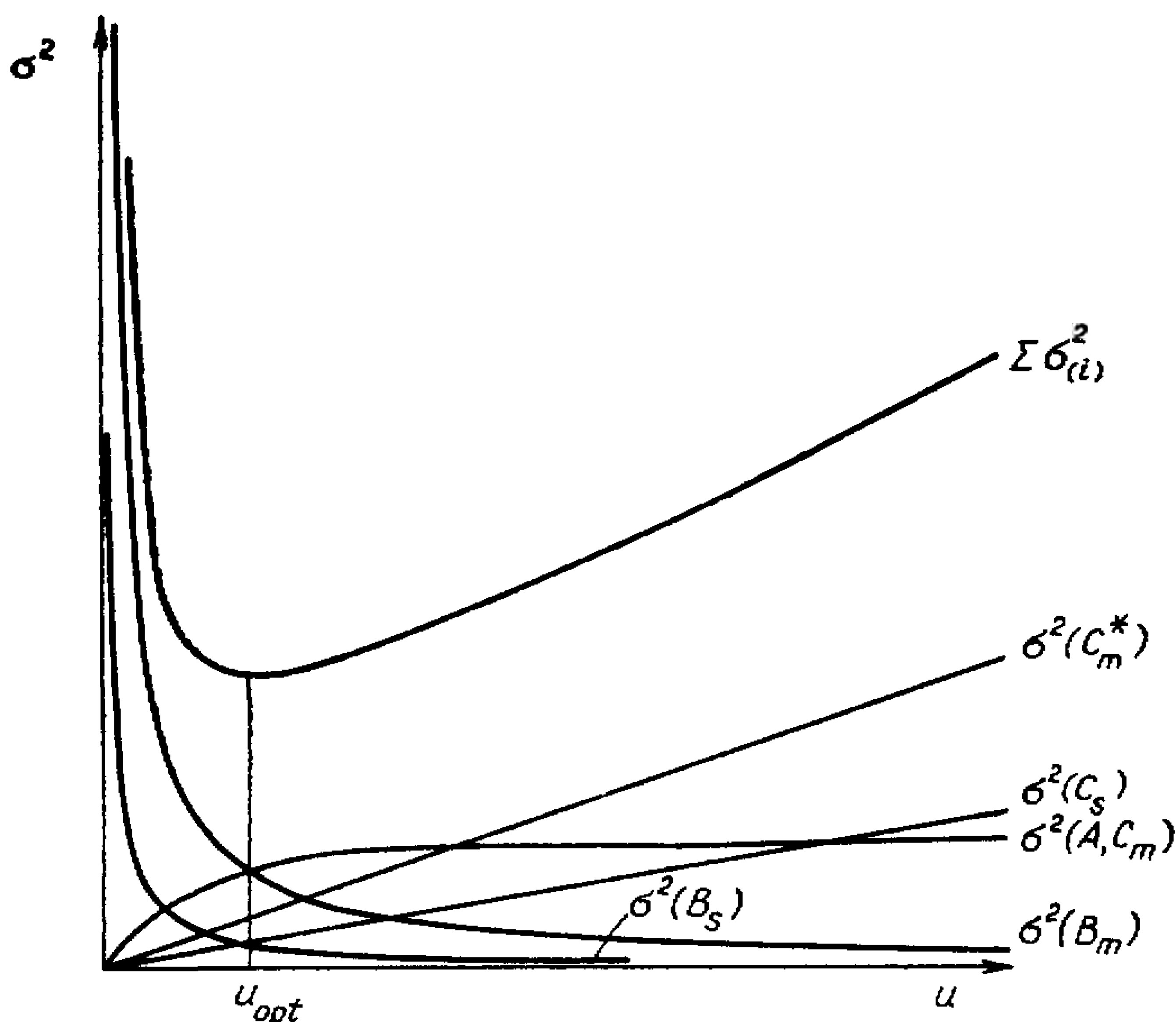


Рис. 2.3. Зависимость слагаемых дисперсии, обусловленных основными факторами, определяющими расширение зоны, и зависимость суммы этих слагаемых от скорости потока подвижной фазы при данной длине хроматографической колонки.

u — скорость течения подвижной фазы; u_{opt} — оптимальная скорость, при которой высота, эквивалентная теоретической тарелке, минимальна; σ^2 — дисперсия ширины зоны, выраженная в единицах длины во второй степени; $\sigma^2(B_s)$, $\sigma^2(B_m)$ — слагаемые дисперсии, обусловленные продольной диффузией растворенного вещества в сорбенте и в подвижной фазе; $\sigma^2(A, C_m)$ — слагаемое дисперсии, обусловленное совместным влиянием вихревой диффузии (неоднородности течения) и нерастворимости подвижной фазы, находящейся между частицами; $\sigma^2(C_s)$, $\sigma^2(C^*_m)$ — слагаемые дисперсии, обусловленные неравновесностью в сорбенте и в подвижной фазе, находящейся в порах частиц; $\Sigma\sigma^2_{(i)}$ — сумма всех этих слагаемых.

для ионообменной хроматографии, при этом произведение $\gamma_s' D_s$ представляет собой эффективный коэффициент диффузии растворенного вещества внутри частицы ионообменника. Для адсорбционной хроматографии справедливо такое соотношение:

$$\Sigma\sigma^2(i) = \sigma^2(A, C_m) + \sigma^2(B_m) + \sigma^2(B_s) + \sigma^2(C_{sa}) + \sigma^2(C^*_m). \quad (2.39)$$

В хроматографии на твердых адсорбентах слагаемое $\sigma^2(C_m^*)$ почти всегда играет важную роль. Уравнение (2.39) можно применять и для описания гель-хроматографии; в этом случае слагаемое $\sigma^2(C_m^*)$ или совсем отпадает, или характеризует возможный вклад адсорбции. Выражения (2.38) и (2.39) справедливы как для газовой, так и для жидкостной хроматографии, но при рассмотрении газовой хроматографии всегда можно пренебречь слагаемым $\sigma^2(B_s)$.

В газовой хроматографии величины u и D_m изменяются вдоль колонки вследствие сжимаемости газов, а в плоскослойной хроматографии скорость движения подвижной фазы зависит от расстояния между фронтом растворителя и уровнем элюирующей жидкости в данный момент времени. В этих случаях справедливость приведенных выше соотношений ограничена, а именно они описывают состояние в определенном сечении колонки или в определенный момент (плоскослойная хроматография), а измеренная суммарная дисперсия относится к усредненным свойствам системы. Кривая зависимости суммарной дисперсии от u при данном L приближенно имеет вид гиперболы [5] с минимумом при определенной величине скорости (u_{opt}). Такая зависимость показана на рис. 2.3.

2.3.2. ПОНЯТИЕ «ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ТАРЕЛКА»

Модель теоретической тарелки [17] основывается на представлении о том, что хроматографическая колонка состоит из ряда отрезков такой длины, что при данных условиях в каждом из них может достигаться равновесное распределение растворенного вещества между обеими фазами. Таким образом, в действительности непрерывный процесс рассматривается как дискретный, в котором параметром, определяющим расширение зоны, является высота H, эквивалентная одной теоретической тарелке. Хотя такая «тарелочная модель» не соответствует действительности, величина H представляет собой полезный критерий оценки разделяющей способности хроматографической колонки. Математический анализ [12] этой модели приводит к простому соотношению, согласно которому высота, эквивалентная одной теоретической тарелке, равняется отношению дисперсии ширины зоны, выраженной в единицах длины во второй сте-

пени, к длине пути перемещения подвижной фазы в колонке, т. е.

$$H=\sigma^2_L/L. \qquad (2.40)$$

Если дисперсия выражена в единицах времени или объема, то

$$H=\sigma_t^2Ru/t_R=\sigma^2_V Ru/V_R F_m. \qquad (2.41)$$

Число теоретических тарелок n в колонке длиной L определяется следующим образом:

$$n=L/H=(L/\sigma_L)^2=(t_R/\sigma_t)^2=(V_R/\sigma_V)^2. \qquad (2.42)$$

Из уравнения (2.40) следует, что факторы, определяющие расширение зоны и выраженные через слагаемые дисперсии (во второй степени единиц длины), можно выразить и через H. Для этого надо просто поделить обе части соответствующих уравнений на величину L.

2.4. ТЕЧЕНИЕ ПОДВИЖНОЙ ФАЗЫ

Общее описание динамики течения дается уравнением Навье — Стокса [18] вместе с уравнением неразрывности. Однако для моделей с такой сложной геометрией, которые используются в хроматографии, решение системы этих уравнений практически невозможно, поэтому проводились поиски более простого подхода, основанного на аналогии между гидродинамикой и электродинамикой. Основой для такого подхода является закон Дарси [4]:

$$u=-(K_0/\varepsilon_0\eta)(dp/dz), \qquad (2.43)$$

где dp/dz — перепад давления в направлении течения. Для полого капилляра коэффициент проницаемости $K_0=r^2/8$, а для колонки, заполненной насадочным материалом, согласно уравнению Козени — Кармана [1, 14]:

$$K_0=d^2_p\varepsilon^2_0/180(1-\varepsilon_0)^2.$$

Для несжимаемой жидкости $-dp/dz=(p_i-p_0)/L$. Таким образом, для хроматографии с жидкой подвижной фазой

$$u=(K_0/\varepsilon_0\eta L)(p_i-p_0). \qquad (2.44)$$

Это соотношение выполняется как для колонок, так и для плоскослойных систем. В первом случае L — это длина колонки, а во втором — расстояние от фронта растворителя до уровня элюирующей жидкости. Для газовой хроматографии соответствующая формула сложнее из-за того, что подвижная фаза сжимаема; в этом случае

$$u(p_0)=(K_0/\varepsilon_0\eta L)(p_i^2-p^2_0)/2p_0. \qquad (2.45)$$

Для определения скорости при среднем давлении можно воспользоваться аналогичным соотношением

$$u(\bar{p}) = (K_0/\varepsilon_0 \eta L)(p_i^2 - p_0^2)/2\bar{p} = u(p_0)\,\bar{p}_0/p = u(p_0)\,j, \qquad (2.46)$$

где j — коэффициент сжимаемости Джеймса — Мартина [13].

$$j = (3/2)\,[(p_i/p_0)^2 - 1]/[(p_i/p_0)^3 - 1]. \qquad (2.47)$$

Учитывая соотношения (2.45) и (2.46), можно более точно выразить основное уравнение удерживания для газовой хроматографии:

$$t_R = (1+k)\int_0^L \frac{1}{u}(z)\,dz = \frac{L(1+k)}{u(p_0)\,j}. \qquad (2.48)$$

Аналогичным способом можно преобразовать уравнения (2.26) — (2.28).

Движущая сила течения пропорциональна разности давлений $p_i - p_0$, где p_0 — это, как правило, атмосферное давление. Для колоночных систем величина p_i зависит от работы, производимой источником подвижной фазы; для плоскослойных систем роль движущих сил выполняют капиллярные силы, а при негоризонтальном расположении еще и гравитационные силы. Весьма упрощенная трактовка модели плоскослойной хроматографии приводит к следующему соотношению, описывающему движение фронта растворителя:

$$u_f = (b/L_f) \pm G, \qquad (2.49)$$

где b — постоянная для данной системы, а G — слагаемое, учитывающее упомянутые гравитационные силы, знаки «плюс» и «минус» соответствуют нисходящему и восходящему хроматографированию; при горизонтальном расположении хроматографической системы G равно нулю.

2.5. СОРБЦИОННОЕ РАВНОВЕСИЕ И КОНСТАНТА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ

Стандартная молярная свободная энергия сорбции Гиббса для находящейся в равновесии системы растворенное вещество — сорбент — подвижная фаза в общем виде выражается уравнением

$$\Delta G_s^0 = -RT\ln(a_{is}/a_{im})_{eq}, \qquad (2.50)$$

где a_{is} и a_{im} — равновесная активность растворенного вещества в неподвижной и подвижной фазе соответственно. Отношение $(a_{is}/a_{im})_{eq}$ представляет собой термодинамическую константу

распределения, числовое значение которой зависит от выбора стандартных и начальных состояний растворенного вещества в обеих фазах. Приведем примеры для ЖЖХ и ГЖХ.

Система жидкость — жидкость. Примем чистый компонент i за стандартное состояние, а бесконечно разбавленные растворы этого компонента в неподвижной и подвижной жидких фазах — за начальные состояния. В указанных условиях летучесть этого компонента в неподвижной и подвижной фазах определяется следующими выражениями:

$$f_{is}=\gamma^*_{is}h_{is}x_{is} \quad \text{и} \quad f_{im}=\gamma^*_{im}h_{im}x_{im},$$

где γ^* — коэффициент активности, характеризующий отклонения от закона Генри. Соответствующие стандартные значения летучести (при $x=1$ и $\gamma^*=1$) равны

$$f^0_{is}=h_{is} \quad \text{и} \quad f^0_{im}=h_{im}.$$

Подставляя эти соотношения в формулу (2.50), получим

$$\Delta G^*_s(\text{ЖЖХ})=-RT\ln(\gamma^*_{is}x_{is}/\gamma^*_{im}x_{im}). \tag{2.51}$$

Система газ — жидкость. В этом случае также в качестве стандартного и начального состояний в неподвижной фазе выбраны чистое вещество i и бесконечно разбавленный раствор этого вещества в сорбенте. В качестве стандартного состояния компонента i в газовой фазе примем состояние чистого компонента в виде идеального газа при давлении 1 атм, а в качестве начального состояния — бесконечно разбавленную смесь этого компонента газом-носителем. В этом случае также

$$f_{is}=\gamma_{is}^*h_{is}x_{is} \quad \text{и} \quad f^0_{is}=h_{is},$$

но

$$f_{im}=\nu_{im}px_{im} \quad \text{и} \quad f^0_{im}=1.$$

Если ввести эти выражения в уравнения (2.50), то мы получим

$$\Delta G^*_s(\text{ГЖХ})=-RT\ln(\gamma^*_{is}x_{is}/\nu_{im}x_{im}). \tag{2.52}$$

Для константы распределения, найденной по формуле $K_D=c_{is}/c_{im}$, где c — число молей растворенного вещества в единице объема данной фазы, легко можно вывести следующее соотношение:

$$K_D=(N_{is}/N_{im})(V_m/V_s)=(x_{is}/x_{im})(v_m/v_s). \tag{2.53}$$

Решая совместно уравнения (2.53), (2.51) и (2.52), получим после некоторых преобразований соответственно для ЖЖХ и ГЖХ:

$$\Delta G_s^*(\text{ЖЖХ})=-RT\ln(K_D\gamma_{is}^*M_s\rho_m/\gamma^*_{im}M_m\rho_s), \tag{2.54}$$

$$\Delta G_s(\text{ГЖХ})=-RT\ln(K_D\gamma_{is}^*M_sp/\nu_{im}RT\rho_s). \tag{2.55}$$

В обоих случаях в жидкой фазе при переходе от начальных состояний бесконечно разбавленного раствора к начальному состоянию чистого компонента i значение ΔG_s^0 должно отличаться от значения ΔG_s^*; для ЖЖХ $\Delta G_s^0=0$, а для ГЖХ $\Delta G_s^0=$ $=\Delta G^0{}_{\text{cond}}$. Таким образом, для жидко-жидкостной хроматографии

$$K_D=\gamma^0{}_{im}M_m\rho_s/\gamma^0{}_{is}M_s\rho_m, \quad (2.56)$$

а для газо-жидкостной хроматографии

$$K_D=RT\rho_s/p^0{}_i\gamma^0{}_{is}M_s, \quad (2.57)$$

где γ^0 — коэффициенты активности, характеризующие отклонение от закона Рауля.

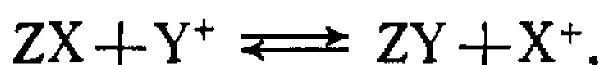
В адсорбционной хроматографии удобно выразить c_{is} как число молей растворенного вещества, приходящееся на единицу массы адсорбента, и выбрать в качестве стандартного состояния растворенного вещества в сорбенте состояние при равной единице концентрации этого вещества, а в качестве начального состояния — состояние с бесконечно малой концентрацией растворенного вещества в сорбенте.

В гель-хроматографии коэффициент емкости определяется как отношение общего числа молей растворенного вещества, находящегося в застойной жидкой фазе внутри частиц, к числу молей этого вещества в текущей жидкой фазе. Следовательно, надо считать, что

$$k=K_D\left[(\varepsilon/\varepsilon_0)-1\right],$$

где ε и ε_0 — соответственно общая пористость и пористость, определенная с учетом только объема между частицами. Конечно, химический состав подвижной фазы один и тот же и в текущей, и в застойной части ее, так что если придерживаться представлений, справедливых для жидко-жидкостной хроматографии [см. уравнение (2.56)], то при этом для любого вещества константа K_D должна быть равна единице, т. е. как будто бы не должно идти никакого разделения. Так и происходит в действительности в том случае, когда размеры пор значительно больше, чем размеры молекул растворенного вещества. Однако в гель-хроматографии константа распределения K_D зависит прежде всего от вероятности диффузии молекул растворенного вещества внутрь пор; эта вероятность существенно различна для разных веществ, если размеры пор в геле сравнимы с размерами молекул растворенных веществ. Вещества, молекулы которых намного больше размеров пор, пройдут через колонку со скоростью, равной скорости движения подвижной фазы в пространстве между частицами. Поэтому в гель-хроматографии величина K_D изменяется от 1 до 0, а величины $t_R(t_E)$ — от L/u

до $L\varepsilon/u\varepsilon_0$, конечно, если механизм этого хроматографического процесса не дополняется адсорбцией. Исходя из представлений об изменениях конформационной энтропии выведены [2] относительные сложные соотношения для K_D в условиях, типичных для гель-хроматографии. В ионообменной хроматографии можно получить выражение для K_D на основе гипотезы Доннана [6], согласно которой отношение активностей двух видов ионов одинаково по обе стороны полупроницаемой мембраны. Таким образом, в случае равновесия для обратимой реакции ионного обмена



$$ZX + Y^+ \rightleftharpoons ZY + X^+,$$

где Z — не участвующая в обмене часть ионообменника, а X^+ и Y^+ — ионы, участвующие в обмене,

$$a(Y^+)_s\, a(X_m{}^+) = a(Y^+)_m\, a(X^+)_s,$$

где a — активности, а индексы s и m обозначают соответственно неподвижную фазу (ионообменник) и подвижную фазу (внешний раствор). Если константа равновесия определена с помощью выражения

$$K_D(Y^+ \rightleftharpoons X^+) = [c(Y^+)/c(X^+)]_s/[c(Y^+)/c(X^+)]_m, \qquad (2.58)$$

то

$$K_D(Y^+ \rightleftharpoons X^+) = [\gamma(X^+)/\gamma(Y^+)]_s\,[\gamma(Y^+)/\gamma(X^+)]_m, \qquad (2.59)$$

где c и γ — концентрации и коэффициенты активности. В формуле, выражающей концентрации растворенного вещества в обеих фазах, к выбору стандартных и начальных состояний относится все то, что было изложено по этим вопросам для растворенного вещества, удерживаемого неподвижной фазой при адсорбционной хроматографии. Выбором этих состояний однозначно определяются величины коэффициентов активности.

2.6. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ

Согласно определению, критерий хроматографического разделения — это расстояние между максимумами двух пиков, отнесенное к полусумме стандартных отклонений для соответствующих зон ($\bar{\sigma}$). Следовательно, разрешение (RS) компонентов 1 и 2 (если $t_{R2} > t_{R1}$) можно выразить соотношением

$$RS = 2(t_{R2} - t_{R1})/(\sigma_{t2} + \sigma_{t1}) = (t_{R2} - t_{R1})/\bar{\sigma}_t. \qquad (2.60)$$

Практически полному разделению соответствует RS, равное 4. Легко показать, что

$$t_{R2} - t_{R1} = (L/u)(1/R_2 - 1/R_1) = (L/u)(k_2 - k_1), \qquad (2.61)$$

$$\bar{\sigma}_t = [(HL)^{1/2}/2u](1/R_2 + 1/R_1) = [(HL)^{1/2}/2u](k_2 + k_1 + 2). \qquad (2.62)$$

Эти формулы показывают, что в то время, как разность значений R для максимумов двух пиков линейно возрастает с увеличением расстояния, на которое перемещается хроматографическая зона, величина среднего стандартного отклонения σ_t возрастает пропорционально квадратному корню из этого расстояния. Это соотношение, показанное графически на рис. 2.4, выра-

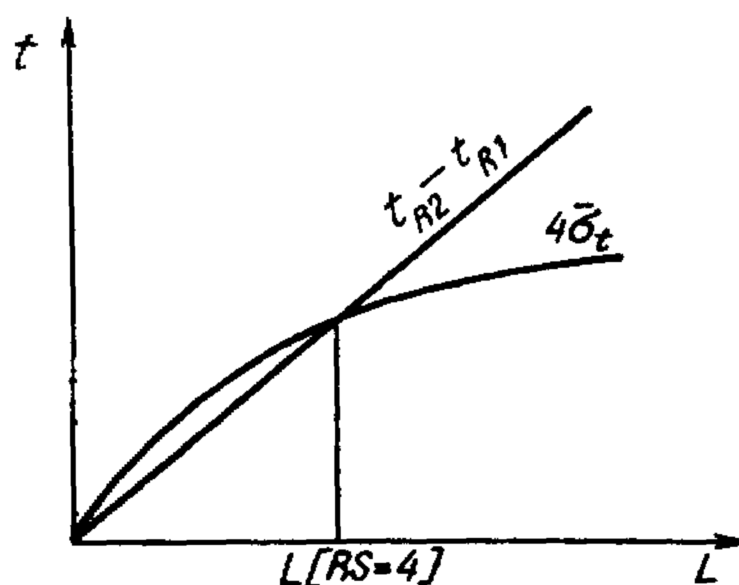


Рис. 2.4. Графическое представление соотношения между разделением максимумов двух хроматографических зон и расширением этих зон в зависимости от длины, на которой совершается хроматографический процесс.

L — длина колонки; $L[RS=4]$ — длина колонки, необходимая для такого разрешения (RS) зон двух веществ (1 и 2), при котором разность их времен удерживания ($t_{R2}-t_{R1}$) равна учетверенной величине выраженного в единицах времени среднего стандартного отклонения σ_t; t — время.

жает основной принцип хроматографического разделения. Решая совместно уравнения (2.61), (2.62) и (2.60), получаем

$$RS=2(L/H)^{1/2}[(R_1-R_2)/(R_1+R_2)]=$$
$$=2(L/H)^{1/2}[(k_2-k_1)/(k_2+k_1+2)]. \quad (2.63)$$

С помощью этого уравнения можно определить число теоретических тарелок, необходимое для практически полного разделения зон компонентов 1 и 2, т. е. для получения разрешения $RS=4$. Поскольку $L/H=n$, то

$$n_{RS=4}=4[(R_1+R_2)/(R_1-R_2)]^2 \quad (2.64)$$

или

$$n_{RS=4}=4[(k_2+k_1+2)/(k_2-k_1)]^2. \quad (2.65)$$

Первое выражение применимо к плоскослойной хроматографии (где R можно заменить на R_f), а второе можно использовать для колоночной хроматографии [k следует заменить на $(t_R-t_M)/t_M$)].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Carman P. C.*, Trans. Inst. Chem. Eng. (London), 15, 150 (1937).
2. *Casassa E. F.*, J. Polymer Sci., 5, 773 (1967).
3. *Chandrasekhar S.*, Rev. Mod. Phys., 15, 1 (1943).

4. *Darcy H.*, Les Fontaines Publiques de la Ville de Dijon, Paris, 1856.
5. *Van Deemter J. J., Zuiderweg F. J., Klinkenberg A.*, Chem. Eng. Sci., **5**, 271 (1956).
6. *Donnan F. G.*, Z. Elektrochem., **17**, 572 (1911).
7. *Giddings J. C.*, J. Chem. Educ., **35**, 588 (1958).
8. *Giddings J. C.*, J. Chem. Phys., **31**, 1462 (1959).
9. *Giddings J. C.*, Anal. Chem., **33**, 962 (1961).
10. *Giddings J. C., Robinson R. A.*, Anal. Chem., **34**, 885 (1962).
11. *Giddings J. C., Stewart G. H., Ruoff A. L.*, J. Chromatogr., **3**, 239 (1960).
12. *Glückauf E.*, Trans. Faraday Soc., **51**, 34 (1955).
13. *James A. T., Martin A. J. P.*, Biochem. J., **50**, 679 (1952).
14. *Kozeny J., Wiener S. B.*, Akad. Wiss., **136**, 271 (1927).
15. *Lapidus L., Amundson N. R.*, J. Phys. Chem., **56**, 984 (1952).
16. *Le Rosen A. L.* J. Am. Chem. Soc., **67**, 1683 (1945).
17. *Martin A. J. P., Synge R. L. M.*, Biochem. J., **35**, 1358 (1941).
18. *Navier M.*, Mem. de l'Acad. d. Sci., **6**, 389 (1827).
19. *Wičar S., Novák J., Rakschieva N. R.*, Anal. Chem., **43**, 1945 (1971).
20. *Wilson J. N.*, J. Am. Chem. Soc., **62**, 1583 (1940).

Глава 3. Бумажная хроматография

З. ПРОХАЗКА, К. ШЕБЕСТА, В. ТОМАШЕК

Институт органической химии и биохимии
Чехословацкой Академии наук, Прага

М. ГЕЙТМАНЕК

Институт химической технологии, Прага

3.1. ВВЕДЕНИЕ

Открытие в 1944 г. метода бумажной хроматографии (БХ), чрезвычайно расширившего возможности обнаружения, идентификации и разделения малых количеств веществ, означало подлинную революцию в химии, особенно в биохимии. Этот метод был открыт Консденом, Гордоном, Мартином и Синджем, которые разработали и применили его для анализа белковых гидролизатов, т. е. смесей аминокислот. Последние два из перечисленных авторов были удостоены Нобелевской премии за открытие распределительной хроматографии. В последующие 10 лет метод БХ был значительно усовершенствован и получил такое распространение, что нельзя было представить без него работу какой-либо химической или биохимической лаборатории. Однако с 1952 г. БХ начала постепенно вытеснять ее «младшая сестра» — тонкослойная хроматография (ТСХ), которая оказалась эффективнее благодаря возможности более быстрого проведения эксперимента, большей пригодности для препаративных работ и более широким возможностям обнаружения (включая применение коррозионно-активных реагентов). В настоящее время ТСХ используется чаще, чем БХ, в примерно 5 и более раз.

Например, анализ статей по хроматографии стероидов, реферированных в библиографическом разделе журнала Journal of Chromatography за время с февраля 1970 г. по февраль 1971 г., показывает [136], что только в 10% работ авторы пользовались БХ, а в 50% — ТСХ. В настоящее время БХ очень редко используют для хроматографирования липофильных соединений. Однако она часто находит применение при анализе гидрофильных соединений, а также в лабораториях, не имеющих достаточных материальных ресурсов, поскольку БХ обходится дешевле, чем ТСХ.

По изложенным причинам в данной главе и во всей монографии основное внимание уделено таким областям применения БХ, где она может дополнять ТСХ или даже конкурировать с ней, и таким методикам БХ, которые мы считаем простыми, более дешевыми и более практичными.

Как и хроматографию вообще, БХ можно разделить на распределительную, адсорбционную и ионообменную, а также на аналитическую и препаративную. По характеру методики мы различаем также проточную (непрерывную) хроматографию, соответствующую проявительной хроматографии в колонках (с тем различием, что не всегда элюируются все зоны), повторное хроматографирование, когда хроматографический процесс прерывают по достижении определенного положения фронта растворителя, хроматограмму сушат, после чего вновь проводят хроматографирование (иногда по нескольку раз) с той же или другой системой растворителей, и, наконец, одно- и двумерную, круговую и центрифужную хроматографию, а также хроматографию на хроматограммах клиновидной формы. В распределительной хроматографии можно выделить нормальную и обращенно-фазную хроматографию. В последнем случае (в отличие от нормального метода) неподвижная фаза более липофильна, чем подвижная фаза. Отдельные типы БХ подробно рассматриваются ниже.

3.3.1. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКАЯ БУМАГА

Хроматографической бумагой называют целлюлозную фильтровальную бумагу, отличающуюся особой чистотой и некоторыми особыми свойствами, а также другие типы бумаги, например бумагу из модифицированной целлюлозы, стекловолокна и т. п. Материалом для изготовления нормальной хроматографической бумаги должна служить возможно более чистая целлюлоза. Обычно для этой цели используют коротковолокнистую целлюлозу, называемую линтером, которая содержит приблизительно 98—99% α-целлюлозы, 0,3—1,0% β-целлюлозы и 0,4—0,8% пентозанов. В пригодной для употребления бумаге иногда имеются примеси, например следы аминокислот, неорганических солей и липофильных веществ (смол и др.). В большинстве случаев эти примеси не мешают хроматографированию, если же они могут повредить, то их надо извлечь из бумаги, промывая ее последовательно разбавленной соляной кислотой, водой или метанолом, ацетоном и т. п., или же использовать имеющуюся в продаже специальную хроматографическую бумагу. Другая важная особенность хроматографической бумаги состоит в следующем: нанесенная на нее жидкость перемещается под действием капиллярных сил по капиллярам, образо-

Таблица 3.1

Характеристика наиболее употребительных марок хроматографической бумаги [76]

Марка бумаги	Удельная масса, г/м²	Толщина, мм	Длительность капиллярного подъема воды на высоту 30 см, мин	Зольность, %	Элюирование на 35 см в системе Партриджа	Характеристика применения
Ватман						
№1	85—89	0,16	140—220	0,06—0,07	15—16	Стандартная
№3 ММ	180	0,31	140—180	0,06—0,07	11	Препаративная
№4	90—95	0,19	70—100	0,06—0,07	9	Быстродействующая
№31ЕТ	190	0,50	60—120	0,025	4	Весьма быстродействующая
№54	90—95	0,17	60—120	0,025	6	Промытая, быстродействующая
Шляйхер-шюлль						
2040a	85—90	0,18	90—140	0,04—0,07	7	Быстродействующая
2043b (GG1)	120—125	0,23	220—260	0,04—0,07	15	Стандартная
2045b (G1)	120—125	0,16	300—400	0,01—0,07	45	Медленнодействующая
2071	600—700	0,67	276—290		23	Препаративная

ванным волокнами бумаги. Количественно эта характеристика бумаги определяется скоростью, с которой растворитель проникает в капилляры, и конечной высотой подъема. Эти характеристики капиллярного подъема зависят от плотности и от густоты сетки волокон бумаги. Чем плотнее бумага (а значит, чем она глаже, менее проницаема и менее прозрачна), тем ниже характеристики капиллярного подъема. Чем волокна рыхлее, тем больше высота подъема. На практике наилучшими оказались сорта бумаги, выпускаемые фирмами Whatman (Балстон, Англия), Schleicher und Schüll, Macherey-Nagel и Ederol (ФРГ), а также бумага марки «Фильтрак» (ГДР) и «Ленинградская бумага» (СССР). Чаще всего пользуются так называемой стандартной бумагой (табл. 3.1). Одна из самых лучших марок — бумага ватман № 4, которая по чистоте и разрешающей способности приближается к ватману № 1, но более плотна, благодаря чему на нее можно наносить бо́льшие количества вещества, а также более эффективно проводить обнаружение. Разделение на этой бумаге идет быстрее, чем на бумаге других марок. Для препаративных целей пригодны также и другие марки толстой

бумаги. Сводка характеристик наиболее широко применяемых марок хроматографической бумаги приведена в табл. 3.1. Бумага из модифицированной целлюлозы применяется все реже. Выпускаются специальные сорта бумаги с повышенным содержанием карбоксильных групп [141], служащие для разделения катионов, например протонированных аминов и аминокислот, но для этого чаще применяются бумаги, пропитанные ионообменниками (например, сильнокислотным ионообменником амберлит SA-2, махерей-нагель или слабокислотным ионообменником амберлит WA-2), или бумаги, изготовленные из химически обработанной целлюлозы («ионообменной целлюлозы»), в частности из карбоксиметилцеллюлозы (ватман CM-82), DEAE-целлюлозы (ватман DE-81), ECTEOLA-целлюлозы (ватман ET-81), фосфатцеллюлозы (ватман P-81) и др. [67, 76a].

Один из наиболее ранних способов модифицирования хроматографической бумаги — ее ацетилирование [68, 85]. Этим способом получены марки ацетилированной бумаги (например, шляйхер-шюлль 2043б/6, 2043б/21, 2043б/45 и махерей-нагель 213Ac, 261Ac и 263Ac), различающиеся по содержанию ацетильных остатков. Эти марки бумаги используются для обращенно-фазной хроматографии липофильных веществ. Позднее было обнаружено, что они вполне пригодны для разделения рацемических смесей, потому что сама ацетилцеллюлоза является хиральным веществом и вследствие этого оптические антиподы перемещаются по ней при хроматографировании с различными скоростями. Для гидрофобизации бумаги применяют также пропитку силиконами, которые затем служат носителями липофильной неподвижной фазы (пропитанная силиконовым маслом бумага — ватман № 1, 4 и 20, шляйхер-шюлль 2043hy; махерей-нагель 202WAA, 261WAA и 263WAA); имеются и другие пропитывающие агенты (каучук, жидкие ионообменники и др.), но только некоторые из них нашли применение в крупносерийном масштабе. Известны также марки бумаги, пропитанной адсорбентами, например оксидом алюминия (ватман TAL/A или шляйхер-шюлль 288), силикагелем (ватман SG 81 или шляйхер-шюлль 289) или карбонатом кальция (шляйхер-шюлль 290).

Основное преимущество бумаг из стекловолокна заключается в их стойкости по отношению к коррозионно-активным реагентам и их низкой адсорбционной способности. Кроме того, разделение на них обычно идет быстрее. Эти марки бумаги используются как в исходном состоянии (иногда после пропитки буферным раствором или другой неподвижной фазой), так и после силанизации или пропитки тонкодисперсным силикагелем. Фирма Gelman Corporation выпускает такую пропитанную силикагелем бумагу из стекловолокна под названием «Инстант тин лейерз».

3.1.2. АППАРАТУРА ДЛЯ БУМАЖНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Учитывая ослабление интереса к бумажной хроматографии, мы рассмотрим только чаще всего употребляемую, доступную или простую аппаратуру для БХ. Более полное описание различных видов аппаратуры можно найти в рекламной литературе и в специальных монографиях по БХ (см., например, [50], а также список литературы в гл. 13). За последнее десятилетие аппаратура и техника БХ почти не совершенствовались. Некоторая работа в этом направлении проведена только Бушем и Кроушоу [19], ее мы обсудим ниже. Список аппаратуры для БХ включает хроматографические камеры или сосуды, стойки с лотками, пипетки для нанесения проб, приспособления для сушки, пульверизаторы, чашки для обнаружения и пропитки, сосуды для элюента, сушильные шкафы, лампы для облучения хроматограмм, приспособления для измерения R_f, а также планиметры и денситометры для количественных определений, копировальные машины и т. д.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ КАМЕРЫ И ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ ПРИСПОСОБЛЕНИЯ

Хроматографические камеры значительно различаются по форме и размерам, и это в большой степени зависит от характера процесса хроматографирования (восходящее, нисходящее, круговое, двумерное, препаративное). Для восходящего, а также двумерного хроматографирования на короткие расстояния обычно пригоден любой цилиндрический сосуд большого диаметра, например большой и высокий химический стакан, большая широкогорлая склянка, стеклянная банка из-под маринада и т. п. (см. рис. 3.1). Короткие и не слишком широкие хроматограммы можно получать методом восходящей БХ даже в конической колбе, а микрохроматограммы — в пробирках (рис. 3.2). Можно свернуть хроматограмму в цилиндр и закрепить по краям так, что она будет стоять, опираясь на дно камеры, и будет погружена в хроматографический растворитель, или как-то подвесить ее, чтобы нижняя часть была погружена в растворитель, находящийся на дне сосуда. Если для этого используют коническую колбу, узкий цилиндр или пробирку, то можно подвесить полоску бумаги в пробирке (укрепив в ней проволочный крючок или разрезав резиновую пробку на две половинки и зажав бумагу между ними и т. п.). Если хроматографической камерой служит сосуд с широким отверстием, можно укрепить над отверстием тонкую проволоку или крепкую нитку и на ней подвесить хроматограмму. Можно закрепить два кусочка резиновой трубки на концах стеклянной палочки длиной

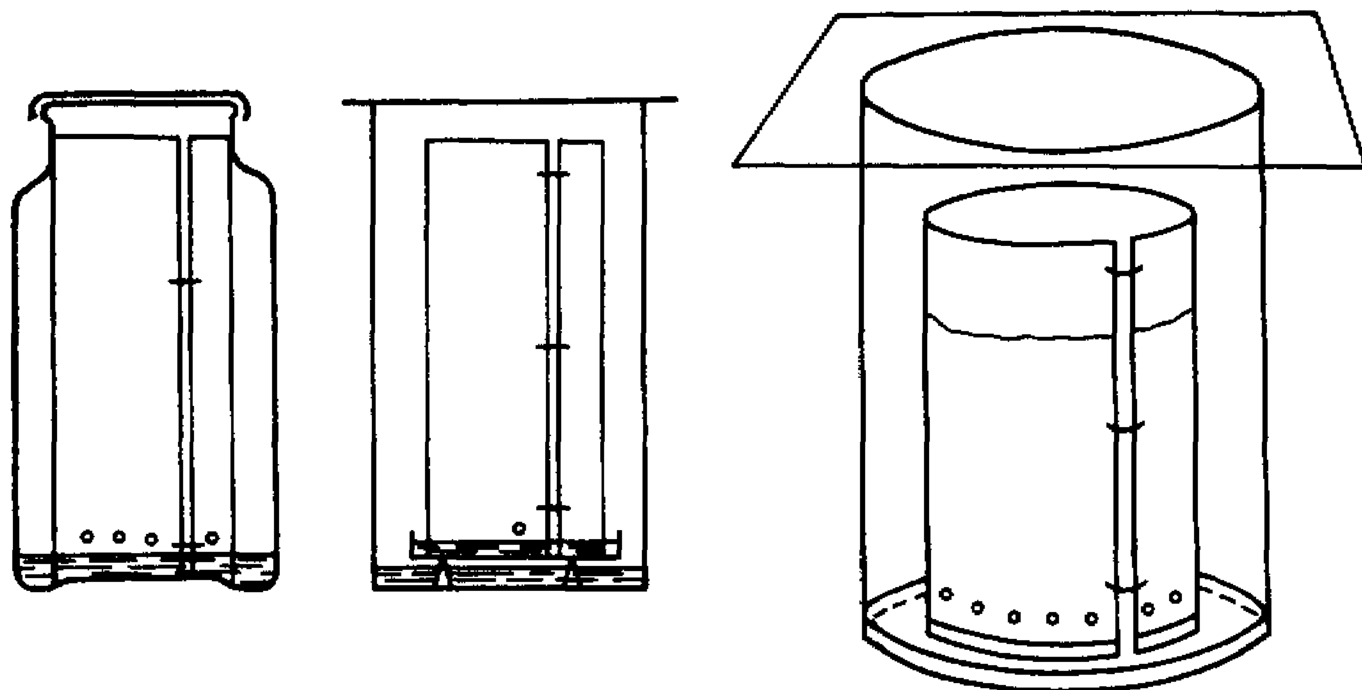
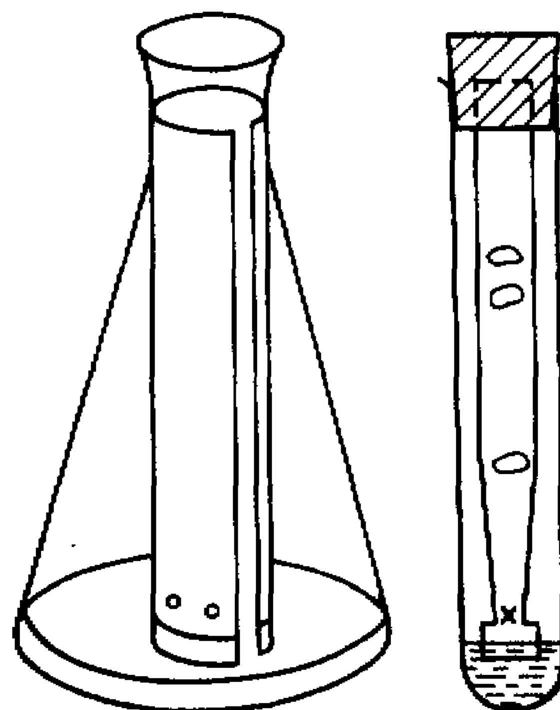


Рис. 3.1. Различные виды камер для восходящей БХ.

немного меньше внутреннего диаметра цилиндрической камеры таким образом, чтобы палочка в результате стала чуть длиннее. Затем надо вставить эту палочку в цилиндр (поперек него и немного ниже его верхнего края), чтобы она держалась достаточно плотно и чтобы на ней можно было подвесить полоску бумаги (рис. 3.3). Для нисходящей хроматографии нужны более широкие и высокие камеры, потому что в них нужно еще поместить стойку или держатель для лотка, в который наливается хроматографический растворитель и помещается конец полоски бумаги. Предложены различные типы камер, лотков, подставок, держателей, крышек и т. д. На рис. 3.4 показаны два типа аппаратуры для нисходящей хроматографии. Желательно, чтобы хроматограмма (полоска бумаги), высовывающаяся из лотка, направлялась далее с помощью горизонтально расположенной (примерно на высоте уровня растворителя) стеклянной палочки, потому что это предохраняет от опасности перетекания растворителя через хроматограмму. Перетекание растворителя, вызванное стеканием или сдуванием, или неосторожным добав-

Рис. 3.2. Коническая колба (колба Эрленмейера) и пробирка, используемые в качестве камер для восходящей БХ на коротких полосках бумаги.



лением растворителя, а иногда самими капиллярными силами, приводит к порче хроматограммы. При наличии такого устройства стартовая линия должна находиться непосредственно под палочкой. Для двумерной БХ на широких листах или препаративной БХ применяют большие камеры и чаще всего проводят нисходящее элюирование. Для этой цели пригодны камеры типа показанной на рис. 3.5, снабженные специальными фарфоровыми лотками (рис. 3.6), однако в настоящее время ими пользуются реже. При хроматографировании на больших лис-

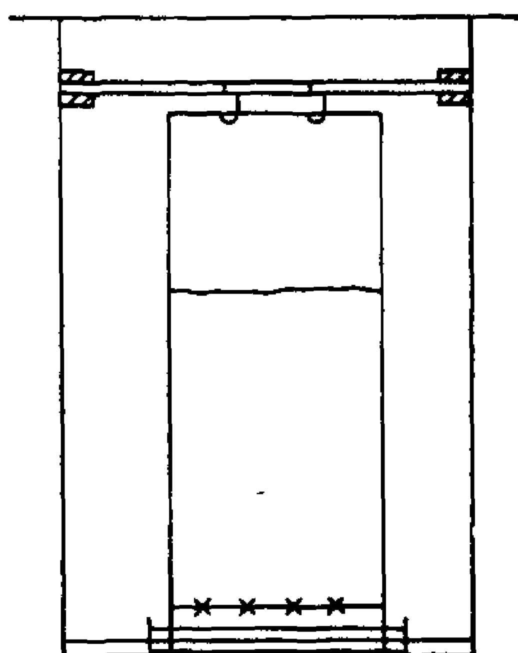


Рис. 3.3. Камера для восходящей БХ с листом хроматографической бумаги, подвешенным на стеклянной палочке, концы которой закреплены кусочками жесткой резиновой трубки.

тах фильтровальной бумаги необходимы специальные щипцы: после смачивания бумага становится очень мягкой и ломкой и брать ее можно только такими щипцами.

Ввиду того что на таких длинных листах процесс разделения продолжается иногда много часов (в зависимости от растворителя и марки бумаги) и поэтому метод БХ не может конкурировать со скоростной ТСХ (в тех случаях, когда оба метода можно было бы использовать с одинаковым успехом), Буш и Кроушоу [19] предложили методику скоростной БХ. Эта методика предусматривает применение более узких камер (рис. 3.7), горизонтального хроматографирования (возможного благодаря наличию специальной металлической рамки), тщательного насыщения атмосферы камеры парами растворяющей системы (применяются липофильные, маловязкие, летучие и быстро впитываемые растворители), а главное — предварительной пропитки бумаги водной неподвижной фазой. Поскольку разделение этим методом ведется на более коротких полосках бумаги, то требуется меньшее количество хроматографируемого вещества, которое наносят на меньшую площадь у стартовой линии (т. е. в виде пятен меньшего размера). Методика работы описана ниже в разд. 3.2.3.

Для круговой хроматографии используют специальные камеры, основой для которых могут служить большие чашки Пет-

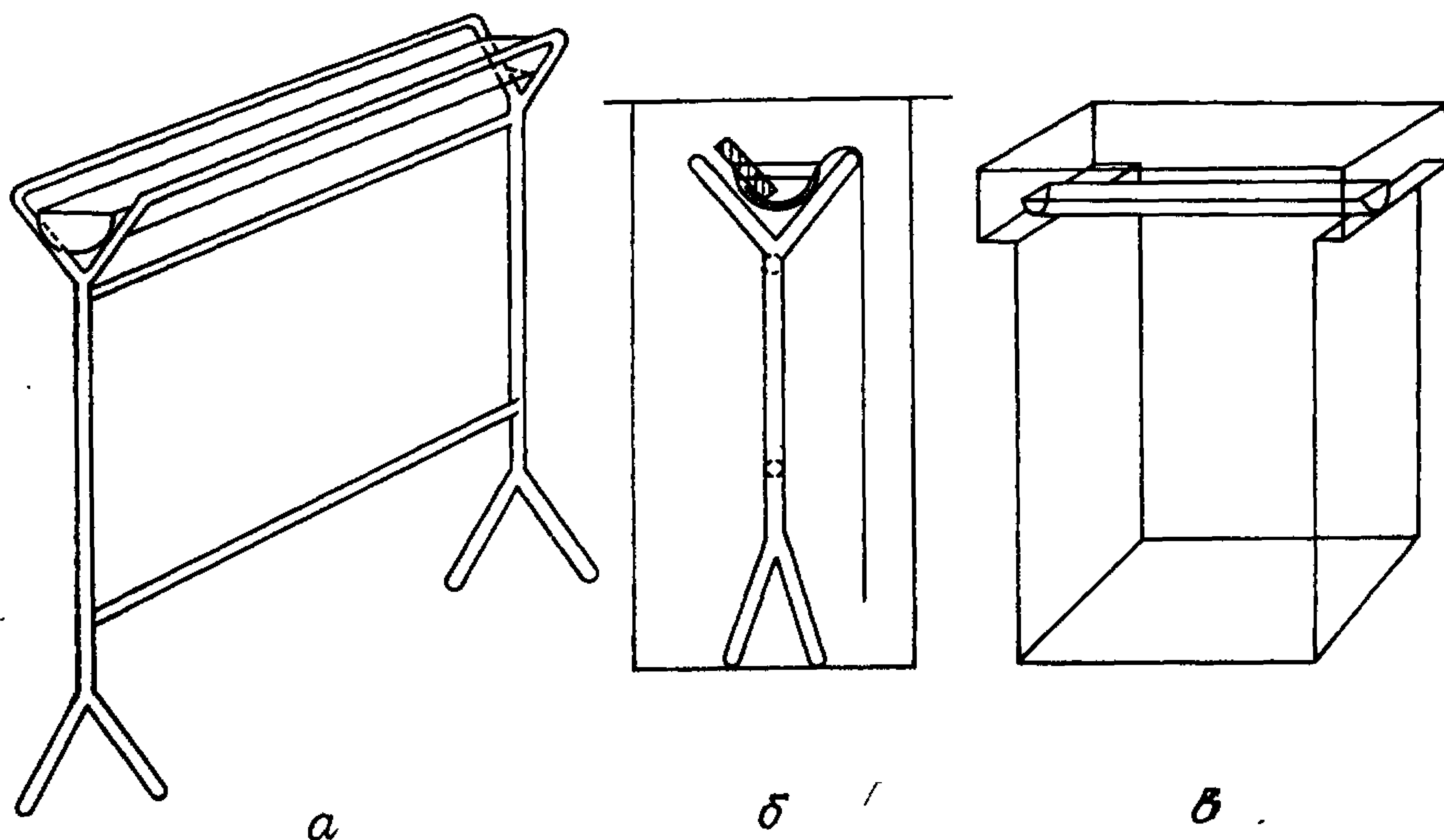


Рис. 3.4. Аппаратура для нисходящей БХ.
а — стойка с лотком; *б* — приспособление для нисходящей хроматографии в собранном виде; *в* — стандартная камера с лотком.

ри или эксикаторы. В первом случае в центре круглого бумажного фильтра помещают тампон, приготовленный из плотно скатанного кусочка фильтровальной бумаги (рис. 3.8, *а*) или из чистого волокнистого материала, промытого растворителем. Можно также использовать опрокинутую маленькую стеклянную воронку (рис. 3.8, *б*) с обрезанным до требуемой высоты носиком, причем эту воронку заполняют хлопковой ватой таким образом, чтобы из носика воронки высовывался и касался цент-

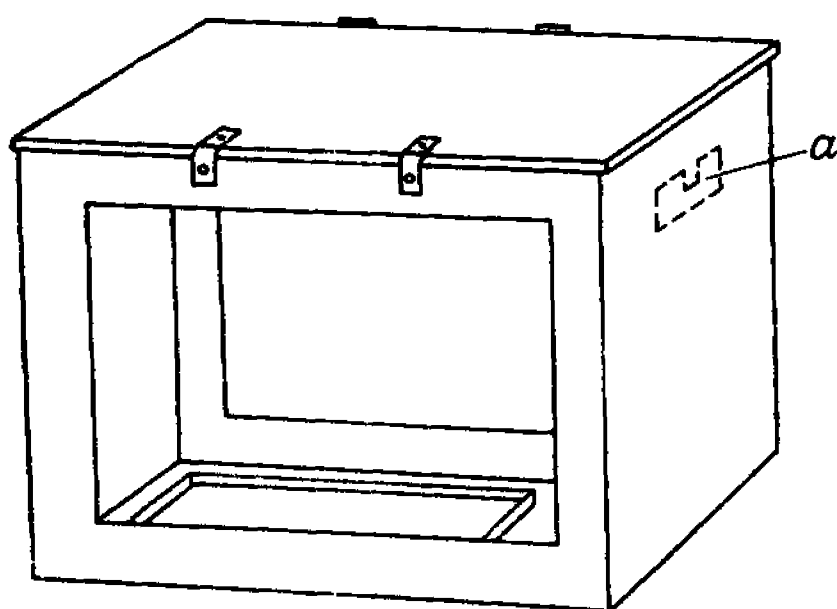


Рис. 3.5. Большая камера (ящик) для хроматографирования на больших листах хроматографической бумаги (*а* — держатель для фарфорового лотка, показанного на рис. 3.6).

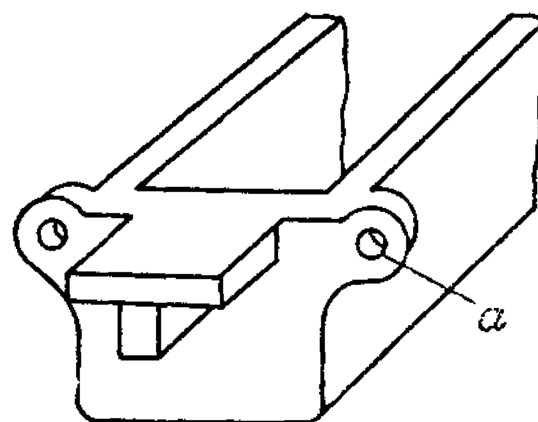


Рис. 3.6. Край фарфорового лотка для хроматографии на больших листах бумаги в камере, показанной на рис. 3.5.
(*а* — отверстие, в которое помещают стеклянную палочку, поддерживающую хроматограмму.)

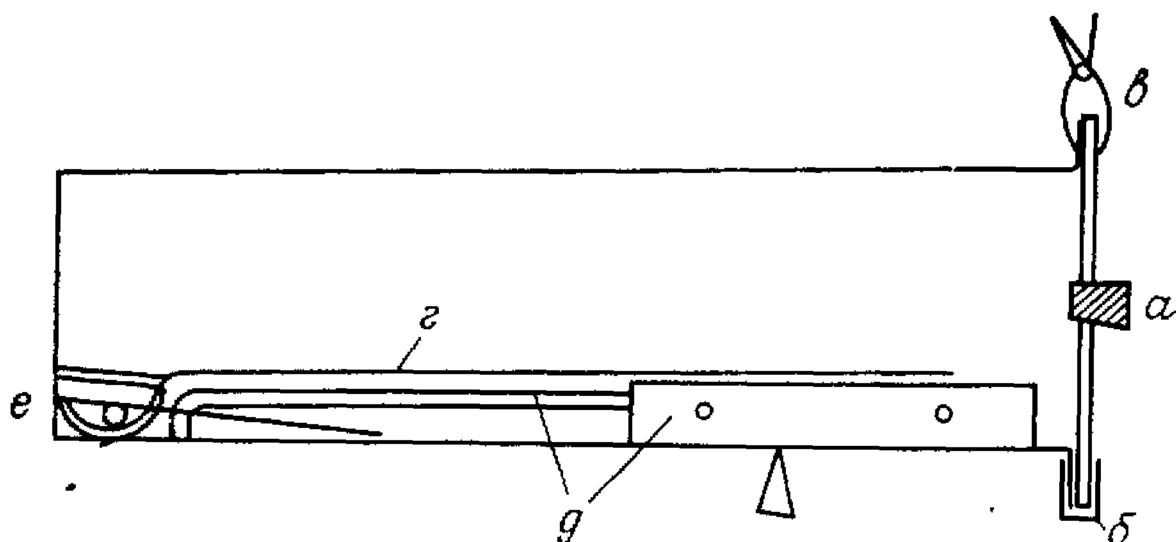


Рис. 3.7. Схема камеры, предложенной Бушем и Кроушоу [19].

а — пробка, закрывающая находящееся в крышке отверстие для ввода растворителя; *б* — крепление крышки с помощью липкой ленты; *в* — зажим; *г* — хроматограмма; *д* — рамка из нержавеющей стали, на которой лежит хроматограмма; *е* — лоток с растворителем.

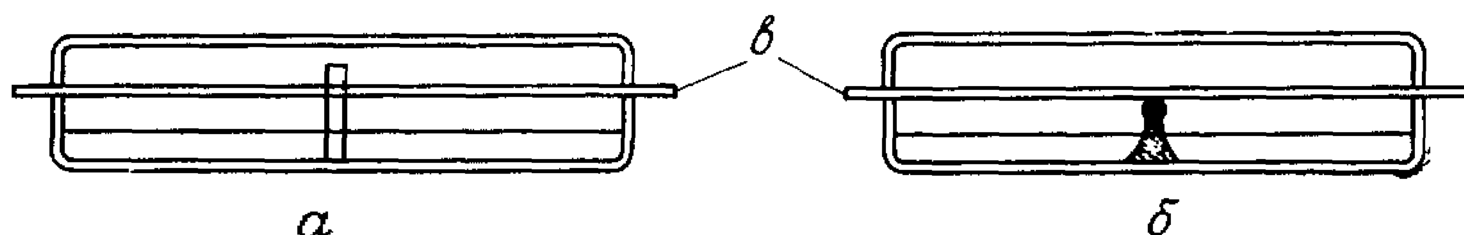


Рис. 3.8. Чашки Петри, используемые как камеры для круговой БХ.

а — в центре находится тампон из скатанной бумаги, впитывающий растворитель; *б* — в центре находится воронка с ватным тампоном, впитывающим растворитель; *в* — фильтровальная бумага.

ра бумажного фильтра маленький тампончик. При использовании эксикатора (рис. 3.9) элюирующий растворитель очень медленно выпускают по каплям на тампон (приготовленный, как указано выше), с которого нужное количество растворителя впитывается круглым бумажным фильтром, а избыток растворителя стекает на дно эксикатора.

ПРИСПОСОБЛЕНИЯ ДЛЯ СУШКИ ХРОМАТОГРАММ

Проще всего подвесить хроматограмму в вытяжном шкафу и держать ее там, пока она не высохнет. Если растворители недостаточно летучи, то надо пользоваться нагретым до нужной

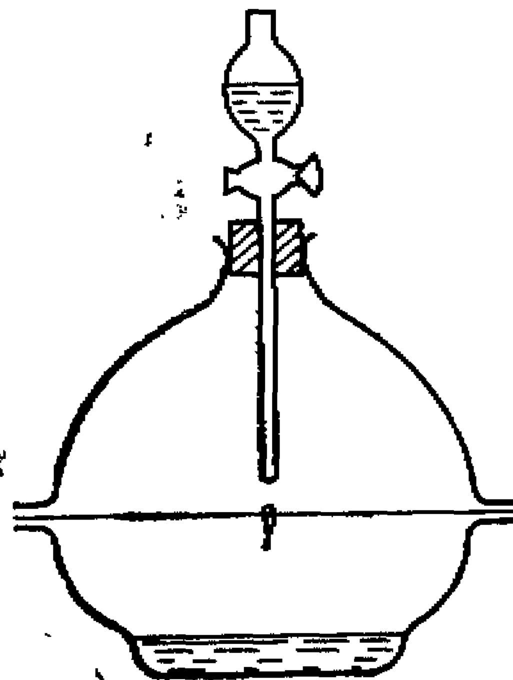


Рис. 3.9. Эксикатор, используемый как камера для круговой БХ.

температуры сушильным шкафом (особенно эффективны сушильные шкафы с циркулирующим теплым воздухом), в котором следует подвесить хроматограммы для сушки. Если сушка хроматограмм проводится в сушильном шкафу, необходимо выполнять требования техники безопасности, обязательные при работе с летучими, воспламеняющимися или взрывоопасными растворителями. Часто используют батарею инфракрасных ламп или даже обычных электрических ламп, расположенных так, чтобы равномерно обогревалась большая поверхность. Хроматограммы меньшего размера можно быстро высушить (даже если разделение велось малолетучим растворителем) под вытяжным колпаком, если просто перемещать их в горизонтальном направлении над горячей поверхностью. При этом необходимо следить, чтобы полоска бумаги находилась достаточно высоко над этой поверхностью, иначе бумага может воспламениться или обуглиться. При наличии некоторого опыта этот метод оказывается наиболее простым.

ПИПЕТКИ ДЛЯ НАНЕСЕНИЯ ПРОБ

В продаже имеются различные микропипетки емкостью от 1 до 50 мкл, предназначенные для нанесения проб. Наиболее простыми являются самозаполняющиеся пипетки, т. е. капиллярные пипетки с сужающимся или резко расширяющимся капилляром, в которых или сразу полностью прекращается подъем жидкости, или он продолжается с сильно замедленной скоростью (рис. 3.10, *б, в*). Тонкие стеклянные капилляры очень удобны, дешевы, и их легко можно изготовить. Обычно наносят 5—10 мкл. Пипетки такого объема легко изготовить, вытягивая стеклянные трубки в капилляры диаметром около 1 мм с суженным кончиком. Кончик капилляра отрезают, а капилляр калибруют (рис. 3.10, *а, г*). Калибровку (конечно, не особенно точную,

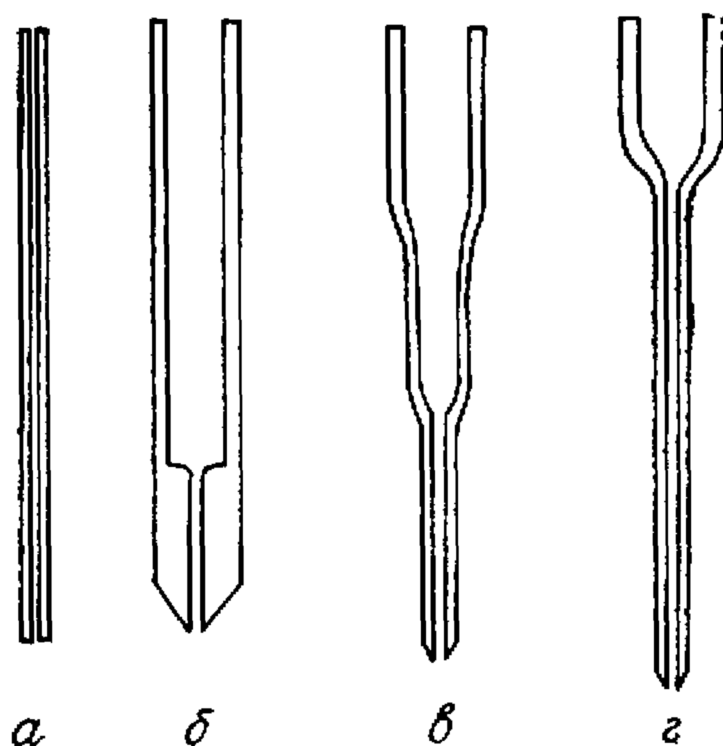


Рис. 3.10. Виды капиллярных пипеток для нанесения проб.

а — срезанный капилляр; *б* — самозаполняющаяся расширяющаяся пипетка; *в* — самозаполняющаяся сужающаяся пипетка; *г* — стеклянная трубка, переходящая в капилляр с суженным концом.

но достаточную для большинства хроматографических операций) можно легко провести с помощью готовой градуированной пипетки емкостью 0,1 мл. Эту пипетку заполняют до метки метанолом и затем, держа обе пипетки почти горизонтально, вводят в капилляр требуемый объем метанола (10 мкл) из кончика градуированной пипетки, слегка наклоняя ее. Положение уровня жидкости в капилляре при ее объеме 10 мкл отмечают, нанося метку восковым карандашом или царапину карборундовым острием, наклеивая нитку и т. д., и после сушки капиллярная пипетка готова к употреблению (рис. 3.10, *г*). Если предстоит отбирать из длинных пробирок, глубоких или узкогорлых колб, желательно не отрезать капилляр от трубки, из которой он был вытянут, так как тогда пипетка будет достаточно длинной и более удобной.

АППАРАТУРА ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ

Уф-лампы. Обычно используют ртутные лампы с фильтрами, пропускающими излучение с длиной волны около 365 нм (фильтр Вуда), например лампы Phillips, Philora HPW, Luma HgU, или с длиной волны 254 нм (Mineralite, Chromatolite).

Пульверизаторы. В литературе описано большое количество видов пульверизаторов. Их легко приобрести, и мы не будем описывать их. На рис. 3.11 показаны три распространенных вида пульверизаторов.

Вместо нанесения реагента на бумагу путем опрыскивания иногда целесообразнее погружать хроматограммы (на полосках

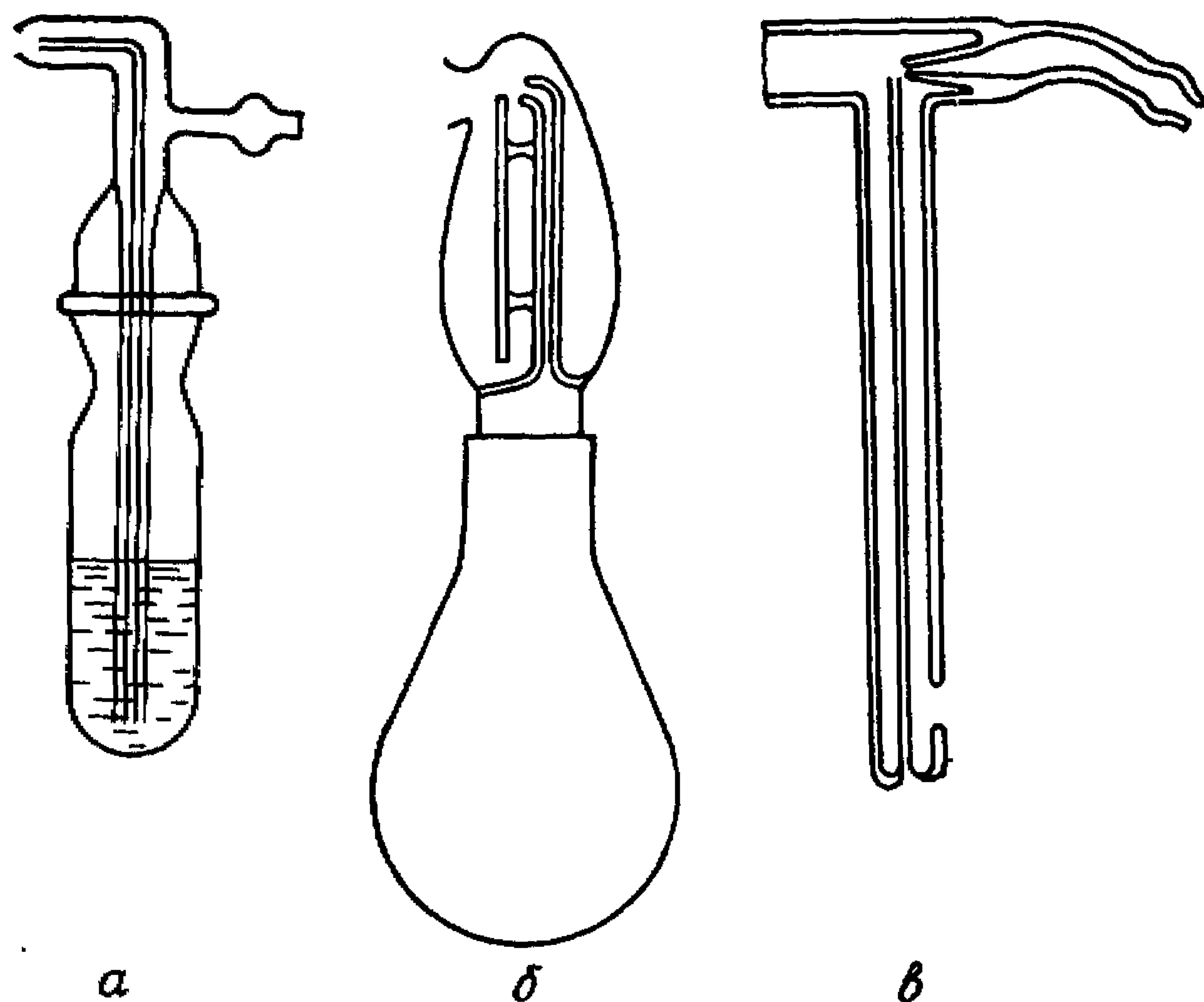


Рис. 3.11. Три вида пульверизаторов.

или даже на листках бумаги) в раствор реагента. Для этой цели служат специальные неглубокие лотки или чашки. При таком методе обнаружения достигается более равномерное смачивание хроматограммы и, следовательно, более равномерное окрашивание пятен.

Аппаратура для копирования хроматограмм. Получить копии хроматограмм, которые постепенно выцветают или даже разрушаются, можно, фотографируя хорошо освещенную хроматограмму с помощью фотокамеры; в некоторых случаях возможно прямое копирование хроматограммы на фотографический материал; кроме того, можно воспользоваться такими методами, как рефлексная фотография или ксерокопирование. Если фотографировать хроматограмму не обязательно, то можно скопировать ее вручную на тонкую прозрачную бумагу, отмечая окрашенные пятна цветными карандашами. Этот метод копирования относительно быстрый, наиболее простой, а учитывая возможность воспроизведения цветов, и наиболее точный.

ИЗМЕРЕНИЕ ЗНАЧЕНИЯ R_f

Согласно определению, величина R_f представляет собой отношение расстояний от центра пятна и фронта растворителя до стартовой линии (см. ниже); эти расстояния обычно измеряют линейкой. Для непосредственных измерений, при которых не

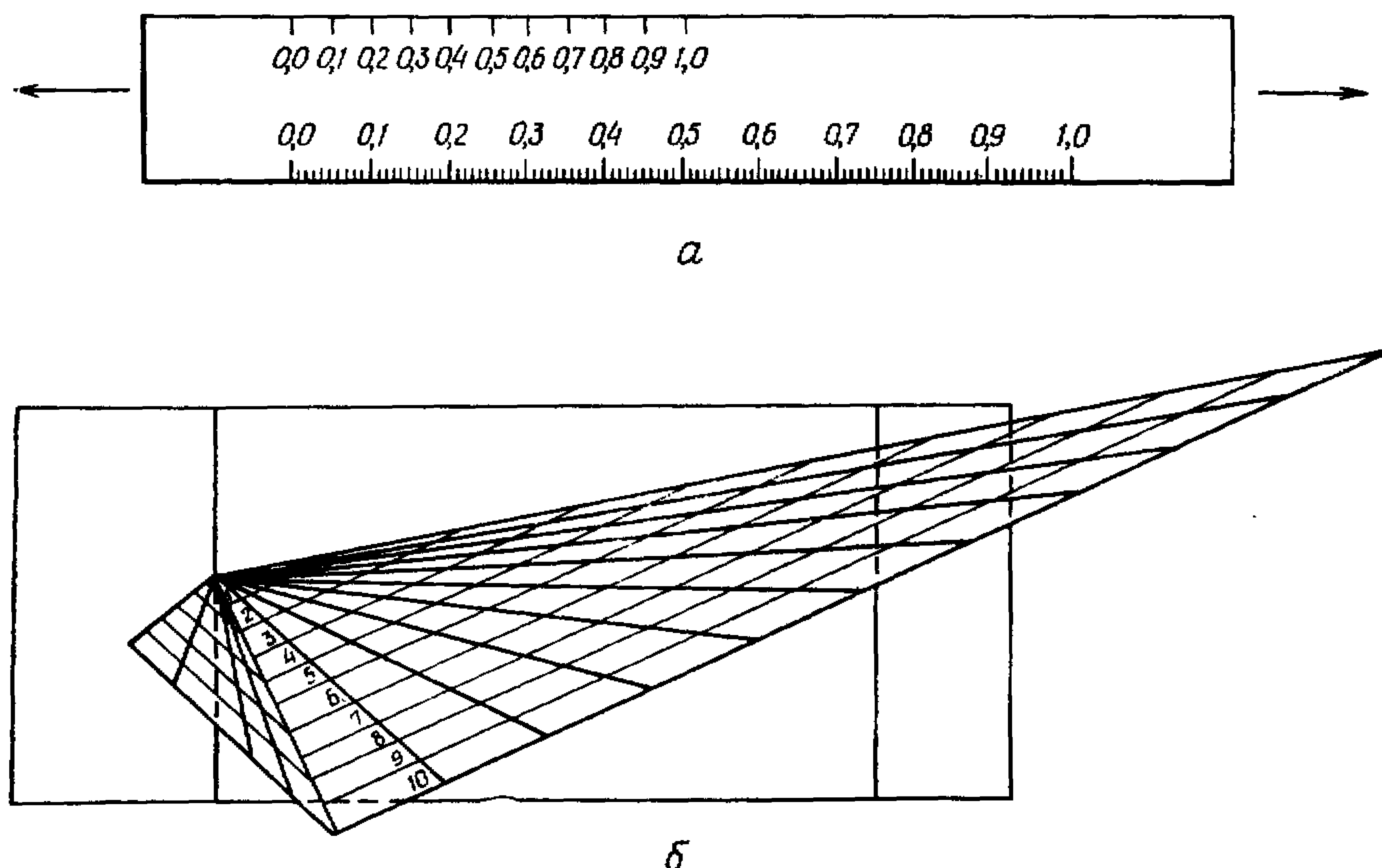


Рис. 3.12. Приспособления для измерения R_f.

а — упругая (растягивающаяся) полоска белой резины длиной около 15 см со шкалой, разделенной на 100 частей; *б* — партогрид из прозрачного пластика (вершину помещают на стартовой линии, а линия $R_f = 1$ на партогриде должна пересечь фронт растворителя).

требуется вычислять отношение, разработаны и изготовлены растягивающиеся упругие линейки (рис. 3.12, *а*), так называемые партогриды (рис. 3.12, *б*). С их помощью можно сразу отсчитывать значения R_f.

АППАРАТУРА ДЛЯ ЭЛЮИРОВАНИЯ ПЯТЕН

Участок бумаги, содержащий пятно, или зону, вырезают, как показано на рис. 3.13, и прямолинейный край этого кусочка помещают между двумя маленькими стеклянными пластинками (покровными стеклами от микроскопа), которые затем погружают в чашку Петри таким образом, чтобы острый край кусочка бумаги был направлен назад, как показано на рис. 3.14. Если налить в чашку растворитель с очень высокой элюирующей способностью, то под действием капиллярных сил он проникает между пластинками и впитывается в бумагу, элюируя пятно;

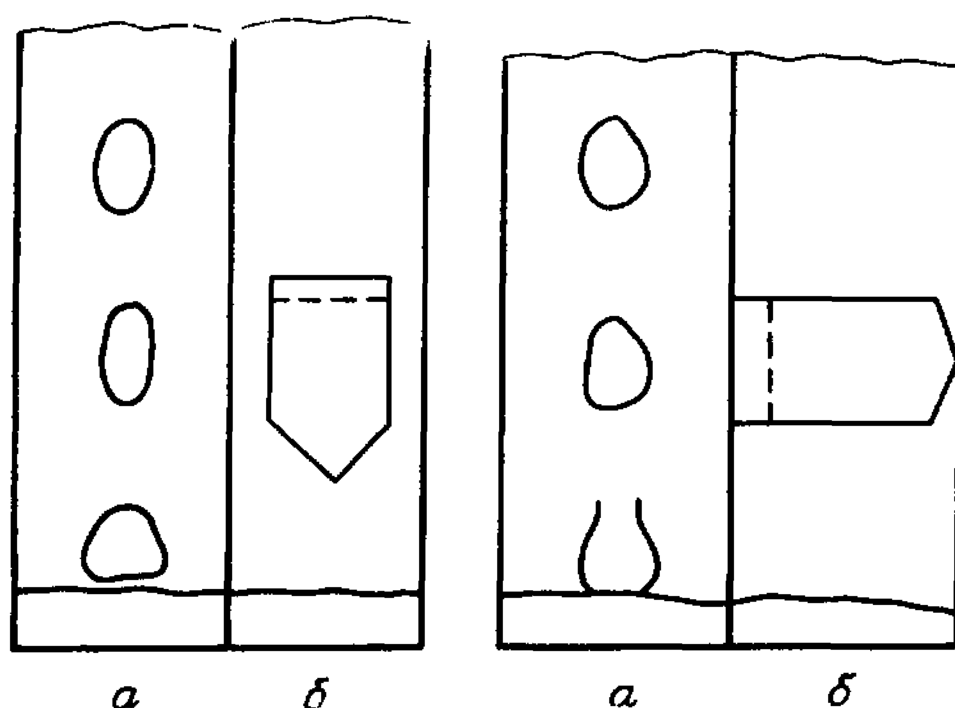


Рис. 3.13. Способ вырезания необнаруженных пятен на хроматограммах с целью последующего элюирования.

а — контрольная полоска с обнаруженными пятнами; *б* — способ вырезания необнаруженного пятна.

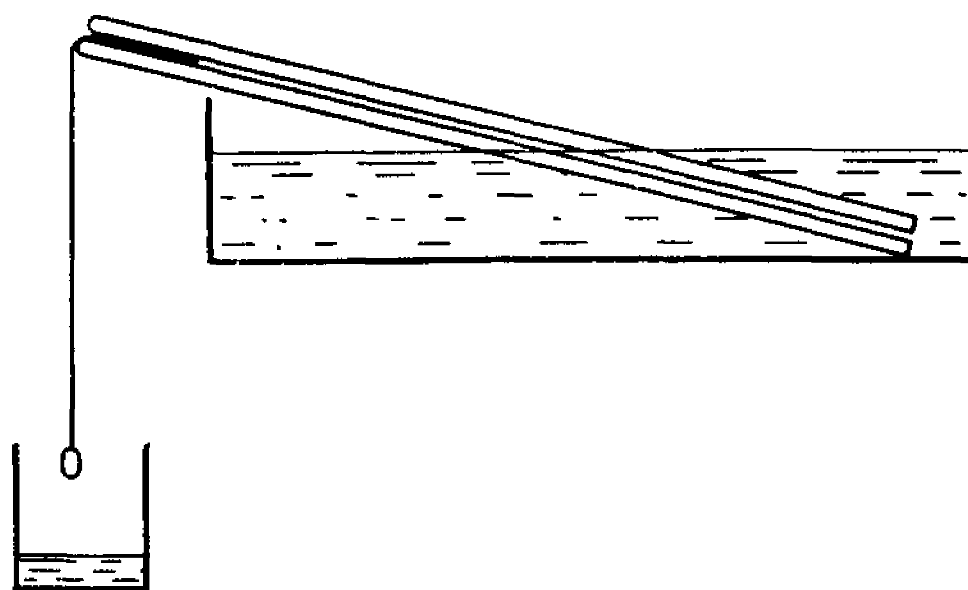


Рис. 3.14. Элюирование пятен с полосок бумаги, вырезанных, как показано на рис. 3.13, и помещенных между погруженными в чашку Петри стеклянными пластинками.

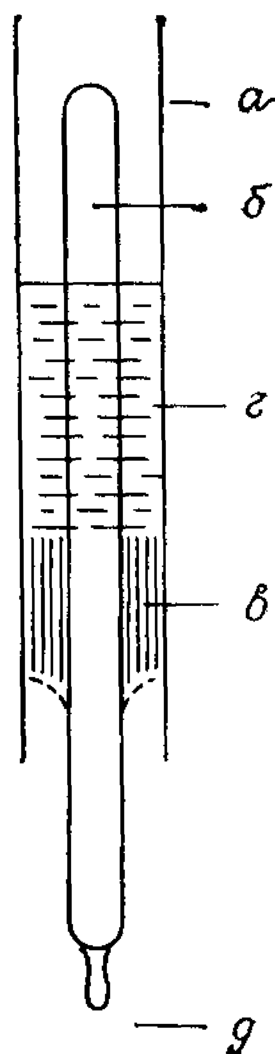


Рис. 3.15. Элюирование зон с широких хроматограмм.

а — полиэтиленовая пленка; *б* — стеклянная пробирка или палочка; *в* — навернутая на пробирку или палочку вырезанная зона; *г* — элюент; *д* — элюат.

элюат при этом каплями стекает с бумаги в подставленный маленький стаканчик.

Если надо провести элюирование всей зоны, например с широкой препаративной хроматограммы, то можно ее вырезать, плотно навернуть на кусок прочной стеклянной палочки, покрытый более широкой полоской полиэтиленовой пленки, и элюировать полученный таким образом бумажный цилиндр, как это делают в колоночной хроматографии (рис. 3.15).

3.1.3. ВЫБОР РАСТВОРИТЕЛЕЙ (ПОДВИЖНОЙ ФАЗЫ)

Чтобы результаты хроматографирования были воспроизводимыми, необходимы очень чистые растворители с постоянными характеристиками. Иногда наличие даже 1% примеси в растворителе может быть причиной значительного изменения значений R_f хроматографируемых соединений. Например, у абсолютного хлороформа элюирующая способность меньше, чем у медицинского хлороформа, содержащего в качестве стабилизатора около 2% этанола. Подобное же влияние оказывает на этилацетат добавка воды: этилацетат легко гидролизуется и образующиеся при гидролизе этиловый спирт и уксусная кислота значительно повышают полярность растворителя. Для обнаружения также требуются высококачественные растворители; примеси могут подавлять флуоресценцию или каким-либо образом нарушать действие обнаруживающих реагентов.

При подборе растворителей следует руководствоваться общим правилом (тем самым правилом, которое было известно

еще алхимикам) — подобное растворяет подобное. Если анализируемые соединения значительно отличаются от растворителя по гидрофильным свойствам или полярности, то нельзя ожидать хороших результатов. Такие соединения или останутся на стартовой линии или будут перемещаться вместе с фронтом растворителя. Растворители обычно классифицируют по элютропным или миксотропным рядам. Если элюирующая способность растворителя заранее не определена экспериментально, то следует руководствоваться следующим основным принципом, применимым также при определении полярности или гидрофильности растворенных веществ: алифатические углеводороды считаются крайними членами ряда, (предположим, начинают его), потому что они наиболее липофильны, т. е. совершенно негидрофильны и неполярны, а замыкает такой ряд вода, поскольку она наиболее гидрофильный и высокополярный растворитель. Степень неполярности парафиновых углеводородов и вообще органических соединений можно, как правило, уменьшить, вводя заместители. Наличие π-электронов двойной связи в растворителе приводит к увеличению его полярности и элюирующей способности и к уменьшению элюируемости вещества на полярных сорбентах или на полярных неподвижных фазах. Так, например, бензол — значительно лучший элюент, чем циклогексан. Распространенный заместитель, не слишком увеличивающий гидрофильность,— это хлор (хотя он может значительно увеличить дипольный момент вещества); другие галогены едва ли имеет смысл рассматривать в этой связи. Например, тетрахлорметан неполярен, хотя содержит сильно электроотрицательные атомы хлора; его молекула симметрична и поэтому не имеет дипольного момента. В то же время хлороформ значительно более полярен благодаря низкой степени симметрии его молекулы и значительному дипольному моменту, а его элюирующая способность значительно выше, чем у тетрахлорметана. Гидрофильные свойства еще более усиливают простые эфирные группы, сложные эфирные группы, оксогруппы и гидроксильные группы (перечислены в порядке усиления влияния). Соединения с нитрогруппой рассматриваются редко, хотя наличие этой группы значительно усиливает полярный и гидрофильный характер вещества; подобным образом действует и тиольная группа. Аминные и карбоксильные группы очень высокополярны даже в неионизованном виде, а в ионизованном состоянии соответствующие соединения становятся крайне гидрофильными. Важную роль играет соотношение между длиной алифатической цепи и числом заместителей. Например, две или три простые эфирные группы в молекуле оказывают такое же влияние на гидрофильный характер вещества, как и гидроксильная группа. Так, например, диэтиловый эфир не смешивается с водой,

а диоксан смешивается. Однако для оценки или предсказания гидрофильного характера веществ не существует строго количественных и общих правил.

На практике возможны два основных способа подбора растворителей.

а. Поиск по литературным источникам таких систем, в которых данное вещество уже хроматографировали, и подбор по опубликованным значениям R_f и другим данным наиболее подходящей системы.

б. Если данное вещество ранее вообще не хроматографировали, то находят такие системы, в которых хроматографировали подобные вещества (в частности, подобные по степени гидрофильности), и тогда можно применять метод проб и ошибок.

Если вещество совершенно гидрофильно, т. е. его нельзя экстрагировать из водного раствора даже таким относительно полярным растворителем, как *н*-бутанол (примеры таких веществ — аминокислоты, сахара), то надо использовать растворяющие системы с высоким содержанием воды, например насыщенный водой *втор*-бутанол (он может содержать до 30% воды), или верхнюю фазу смеси *н*-бутанола, уксусной кислоты и воды в соотношении 4 : 1 : 5, ставшей классической (система Партриджа), или систему изопропиловый спирт — аммиак (7 : 3 или 8 : 2 и т. п.), или 15%-ную уксусную кислоту. Среднегидрофильными считаются вещества, которые хорошо экстрагируются из воды этилацетатом, хуже эфиром или хлороформом и не экстрагируются бензолом и петролейным эфиром. Для их хроматографирования подходят системы, содержащие растворители средней полярности, например бутилацетат, изопропиловый эфир или хлороформ, часто содержащий добавки малых количеств полярных растворителей или даже воды. Для хроматографирования соединений, очень плохо растворимых в воде, но хорошо растворимых в липофильных растворителях, основными компонентами подвижной фазы служат бензол, циклогексан, тетрахлорметан, толуол и т. п. Для хроматографирования соединений совершенного липофильного характера (жирные кислоты, стерины, каротиноиды и др.) следует применять обращенно-фазные системы, в которых липофильный растворитель (парафиновое масло, керосин, силиконовое масло, каучук и т. п.) используют как неподвижную фазу, а обводненные спирты и подобные им полярные растворители — в качестве подвижных фаз. При работе с этим типом веществ целесообразно также применять в качестве неподвижной фазы бумагу, пропитанную нелетучими органическими растворителями, которые не смешиваются с липофильными жидкостями. К таким растворителям относятся, в частности, формамид, диметилформамид, этиленгликоль, пропиленгликоль, бромнафталин.

При подборе растворяющих систем можно использовать табл. 3.2, в которой приведен миксотропный ряд растворителей. Если имеется вещество с совершенно неизвестной структурой и природой, то полезно сначала попробовать провести хроматографирование его в каком-либо растворителе из средней части таблицы, не забывая привести бумагу в равновесие с парами воды (см. разд. 3.2.3). Если в этом растворителе получается очень высокое значение R_f, это означает, что испытуемое вещество слишком липофильно по отношению к данному растворителю, и, следовательно, для хроматографирования данного вещества надо использовать еще более липофильный растворитель, т. е. какой-либо растворитель, расположенный внизу таблицы. Если, наоборот, значение R_f в первом растворителе слишком низко, то это означает, что используемое соединение слишком гидрофильно для этого растворителя и, чтобы улучшить разделение, необходим более полярный растворитель, т. е. расположенный вверху таблицы. Чтобы решить, с какого растворителя начинать испытания, если известен элементный состав вещества, удобно использовать атомарное отношение С/О — отношение числа углеродных и кислородных атомов в молекуле. Если это отношение мало, следовательно, вещество гидрофильно, и наоборот (см. выше, а также последний столбец табл. 3.2). Для соединений, содержащих азот или серу, можно условно считать, что один атом азота приблизительно соответствует двум атомам кислорода, а один атом серы одному атому кислорода.

После того как найден растворитель, при элюировании которым вещество не остается у стартовой линии и не движется вместе с фронтом этого растворителя, а остается где-то близко к середине хроматограммы, может оказаться, что данное вещество все-таки не отделяется от какого-либо другого компонента. В таком случае можно надеяться, что эти два вещества удастся разделить другим растворителем с подобной полярностью. С этой целью полезно испробовать растворители, одинаковые по разделяющей способности, иначе говоря, такие растворители, в которых константы распределения или значения R_f разделяемых веществ очень близки к этим величинам в первой растворяющей системе. В подобных растворителях степень разделения двух данных компонентов может быть значительно лучше. Конечно, такие растворители не должны слишком сильно отличаться по полярности, и в табл. 3.2 они должны быть расположены близко друг к другу.

Здесь следует подчеркнуть, что поскольку в БХ мы почти всегда имеем дело с распределительным принципом хроматографии (т. е. с жидко-жидкостной хроматографией), то используемые растворители необходимо насыщать водой, бумага также должна быть достаточно влажной. Далее, если нужно подобрать

Таблица 3.2

Миксотропный ряд растворителей [50, 51]

Растворитель	Растворимость воды, мл/100 мл растворителя [а,б]	Диэлектрическая проницаемость при комнатной температуре	ΔR_M		Годен для С/О (см. текст)
			CH_2	COOH	
Вода		81,1			
Молочная кислота		23			
Формамид		84			
Морфолин					
Муравьиная кислота		58,5			
Ацетонитрил		38,8			
Метиловый спирт		31,2			
Уксусная кислота		6,3			
Этиловый спирт		25,8			
Изопропиловый спирт		26			
Ацетон		21,5			
н-Пропиловый спирт		22,2			
Диоксан		3			
Пропионовая кислота		3,15			
Тетрагидрофуран					
трет-Бутиловый спирт[а)]					
Изомасляная кислота	20	2,6			
втор-Бутиловый спирт	12,5		—0,18	0,40	
Метилэтилкетон	35,3(10)	18	—0,18		
Циклогексанон	2,4(31)	18,2	—0,17	0,43	
Фенол	6,7(16)	9,7	—0,23		
трет-Амиловый спирт					
н-Бутиловый спирт	7,9	19,2	—0,20	0,50	
м-Крезол	2,4				1—2
Циклогексанол	5,7(15)	15	—0,23	0,65	
Изоамиловый спирт	2,7(22)				
н-Амиловый спирт	2,7(22)	16			
Бензиловый спирт	4(17)	13	—0,28	0,50	
Этилацетат	8,6	6,1	—0,27	0,98	
н-Гексиловый спирт	0,6		—0,25	0,72	
симм-Коллидин	3,5				
Валериановая кислота	3,7(16)		—0,32	0,46	
Этилформиат	11,8(25)		—0,24	0,64	
Изовалериановая кислота	4,2		—0,31	0,36	
Фуран					
Диэтиловый эфир	7,5	4,4	—0,32	1,05	
н-Октиловый спирт			—0,32	0,85	
Диэтоксиметан			—0,29	0,67	
Капроновая кислота	0,4		—0,37	0,54	
н-Бутилацетат	0,5(25)	5	—0,28	0,68	2—3
Диизопропоксиметан			—0,30	0,92	
Дипропоксиметан			—0,32	0,81	
Нитрометан		39	—0,24	1,33	
н-Бутилбромид			—0,34		
Диизопропиловый эфир	0,2		—0,33	1,20	
н-Бутилбутират			—0,34	1,18	
н-Пропилбромид	0,3		—0,37		
Ди-*н*-бутиловый эфир			—0,36		
Метиленхлорид	2				

Продолжение табл. 3.2

Растворитель	Растворимость воды, мл/100 мл растворителя[а,б]	Диэлектрическая проницаемость при комнатной температуре	ΔR_M		Годен для С/О (см. текст)
			CH_2	COOH	
Хлороформ	1(15)	5,1			
Диизоамиловый эфир			—0,40		
Дихлорэтан	0,6				
Бромбензол	0,05(30)	5,4			
Трихлорэтан					
Дибромэтан					
Этилбромид	0,9				
Бензол	0,08(22)	2,24	—0,42		3—5
Пропилхлорид	0,27				
Толуол	0,05(16)	2,3			
Ксилол		2,6			
Тетрахлорид углерода	0,08	2,25	—0,44	1,61	
Дисульфид углерода		2,6			
Декалин		2,13			
Циклопентан					5—15
Циклогексан		2,1			
Гексан	0,01(15)	1,88			
Гептан	0,005(15)	1,97			
Керосин					
Жидкий парафин					

[а] Растворители до *трет*-бутанола включительно смешиваются с водой в любых соотношениях.

[б] Если в скобках не указана другая температура, то приведенные значения относятся к растворимости при 20 °С.

несколько более или несколько менее полярный растворитель, то не всегда следует искать растворитель, отличный от исходного. Полярность растворяющей системы можно подогнать, добавляя какой-либо другой сильнополярный или неполярный растворитель. Обычно добавляют небольшие количества сильнополярных растворителей к неполярным растворителям.

Даже если удалось найти такой растворитель или такую смесь растворителей, в которой анализируемые соединения имеют достаточно различающиеся значения R_f, пятна этих соединений могут оказаться вытянутыми, и это снизит эффективность и качество разделения. Причиной образования таких вытянутых пятен может быть слишком низкая растворимость разделяемых веществ в использованной растворяющей системе, слишком высокая концентрация вещества в пробе, адсорбция вещества на целлюлозе или диссоциация веществ в процессе их хроматографирования. В первом случае можно улучшить форму пятна и, таким образом, улучшить разделение, подобрав другой растворитель, в котором растворимость данного вещества выше, или

найдя более чувствительный метод обнаружения, который позволит уменьшить количество вещества в пробе. Адсорбцию обычно можно подавить, добавляя более полярный компонент к растворяющей системе, лучше смачивая бумагу или пропитывая ее полярным органическим растворителем в качестве неподвижной фазы. В случае диссоциации хроматографируемых веществ можно улучшить форму пятен, добавляя к растворяющей системе более сильную кислоту или основание (преимущественно летучие). Это приведет или к полной диссоциации вещества, или к полной ассоциации его. В первом случае хроматографируются не нейтральные молекулы, а ионы, которые обычно очень сильно полярны, поэтому можно использовать более полярные растворители, не опасаясь адсорбции. Во втором случае остаются недиссоциированные формы веществ, которые всегда более липофильны, и поэтому для хроматогра-

Таблица 3.3

Рекомендуемые для БХ системы растворителей, расположенные в порядке убывания их полярности [87]

№ п/п	Системы растворителей	Объемное соотношение компонентов
1	Уксусная кислота — вода[а]	15:85
2	Изопропиловый спирт — концентрированный аммиак — вода[а]	10:1:1
3	Фенол — вода	б
4	*н*-Бутанол — 1,5 М аммиак	1:1
5	*н*-Бутанол — уксусная кислота — вода	4:1:5
6	Этилацетат — вода	б
7	Бутилацетат — вода	б
8	Диизопропиловый эфир — вода	б
9	Хлороформ/формамид[в]	б
10	Бензол/формамид[в]	б
11	Тетрахлорметан — уксусная кислота — вода	10:3:5
12	Петролейный эфир — метанол — вода	10:8:2
13	Гексан/формамид[в]	б
14	Гексан — диметилформамид[г]	б
15	Метанол — *н*-бутанол — вода/керосин[д]	80:5:15[е]
16	Этанол — вода/керосин[д]	8:2[е]
17	*н*-Пропанол — вода/керосин[д]	88:12[е]
18	Бензиловый спирт/керосин[д]	б

[а] Однофазные системы.

[б] Первый растворитель насыщен вторым.

[в] Бумагу пропитывают формамидом.

[г] Бумагу пропитывают диметилформамидом.

[д] Обращенно-фазные системы, почти не применяемые в настоящее время. Бумагу пропитывают керосином, который можно заменить на парафиновое масло, особо чистое оливковое масло или бромнафталин и т. п.

[е] Указанное соотношение относится только к подвижной фазе.

фии можно применять более липофильные растворители. При этом будут играть бо́льшую роль структурные различия веществ и будут достигнуты бо́льшие различия в значениях R_f. Очевидно, что правильный выбор величины pH неподвижной фазы также важен для получения хорошего разделения веществ, которые могут диссоциировать.

При подборе растворяющих систем, одинаковых по разделяющей способности, для разделения нейтральных веществ полезно учитывать электроно- или протонодонорный или акцепторный характер растворителя и растворенного вещества. Протоноакцепторные соединения, в частности кетоны, сложные и простые эфиры, обладают большим сродством к растворителям с донорными свойствами, а именно хлороформу, спиртам, фенолам и т. п., сильнее притягиваются к ним и легче переносятся ими и наоборот. Поэтому при перемене растворителя иногда может измениться порядок элюирования веществ. В табл. 3.3 перечислены системы растворителей, чаще других применяемые в БХ.

3.1.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЕЛИЧИН R_f И R_M, ИХ ИЗМЕРЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ

На полоске фильтровальной бумаги (рис. 3.16) отмечают карандашом стартовую линию на расстоянии примерно 2—10 см от края полоски и на эту линию наносят каплю раствора тех веществ, которые надо разделить. Когда растворитель испарится и пятно высохнет, полоску кладут в лоток и переносят в хроматографическую камеру (см. рис. 3.4), где ее выдерживают до достижения равновесия, а затем наливают в лоток нуж-

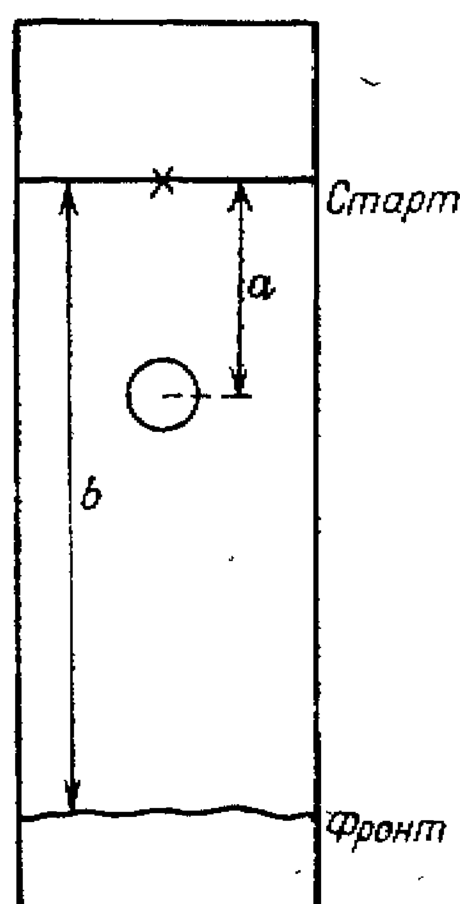


Рис. 3.16. Измерение величин R_f на хроматограмме.

ный растворитель. Под действием капиллярных сил растворитель поднимается вверх по бумаге. Когда фронт растворителя достигнет требуемого уровня, полоску вынимают, сразу отмечают положение фронта, дают растворителю испариться, после чего на полоске проводят обнаружение пятен. Получают хроматограмму, например, в таком виде, как показано на рис. 3.16. Если растворитель правильно подобран, то пятно не располагается ни у стартовой линии, ни у фронта растворителя, а находится где-то между ними. Расстояние между пятном и стартовой линией зависит от природы растворителя, продолжительности элюирования, степени насыщенности атмосферы камеры парами растворителя, влажности бумаги или атмосферы камеры, типа бумаги, температуры и т. д., но главным образом от природы, т. е. от структуры вещества. Это расстояние является типичной характеристикой определенного вещества, которая остается постоянной при постоянных условиях хроматографирования (см. выше). Поскольку растворитель может перемещаться на различные расстояния при восходящем или нисходящем хроматографировании, расстояние от стартовой линии до пятна характеризуют относительной величиной — отношением указанного расстояния к расстоянию от стартовой линии до фронта растворителя. Величина R_f данного вещества определяется по формуле

$$R_f = a/b. \tag{3.1}$$

Вместо величины R_f иногда используют величину R_X, где X — какое-то известное вещество, применяемое в качестве стандарта. Значение R_X данного вещества выражает отношение расстояния от стартовой линии до пятна данного вещества к расстоянию, пройденному стандартным веществом X от стартовой линии. Эту величину используют преимущественно в проточной хроматографии, где растворитель, достигнув края бумаги, стекает с него, так что расстояние между фронтом растворителя и стартовой линией измерить нельзя, но можно определить расстояние, пройденное стандартным веществом. Поэтому стандартное вещество не должно перемещаться по хроматограмме слишком быстро, так как иначе оно тоже может стечь с бумаги.

К величинам R_f в круговой хроматографии применимо следующее соотношение [75]:

$$R_f(\text{круг.}) = \sqrt{R_f(\text{лин.})}. \tag{3.2}$$

При многократном хроматографировании, при котором n раз проводят элюирование одним и тем же растворителем, можно, если известна величина R_f однократного элюирования, опреде-

лить с помощью уравнения, предложенного Джинсом, окончательную величину $\overline{R}_f$ [65]

$$\overline{R}_f = 1 - (1 - R_f)^n. \qquad (3.3)$$

Величины R_f могут изменяться только в пределах от 0,00 до 1,00, и чем ближе эти величины к нулю или единице, тем хуже разделение для данного вещества. Лучшая избирательность разделения наблюдается при R_f, близких к середине хроматограммы. По ряду причин, которые мы обсуждать здесь не будем, наилучшая избирательность соответствует величинам R_f от 0,1 до 0,7 и иногда до 0,8 [75а].

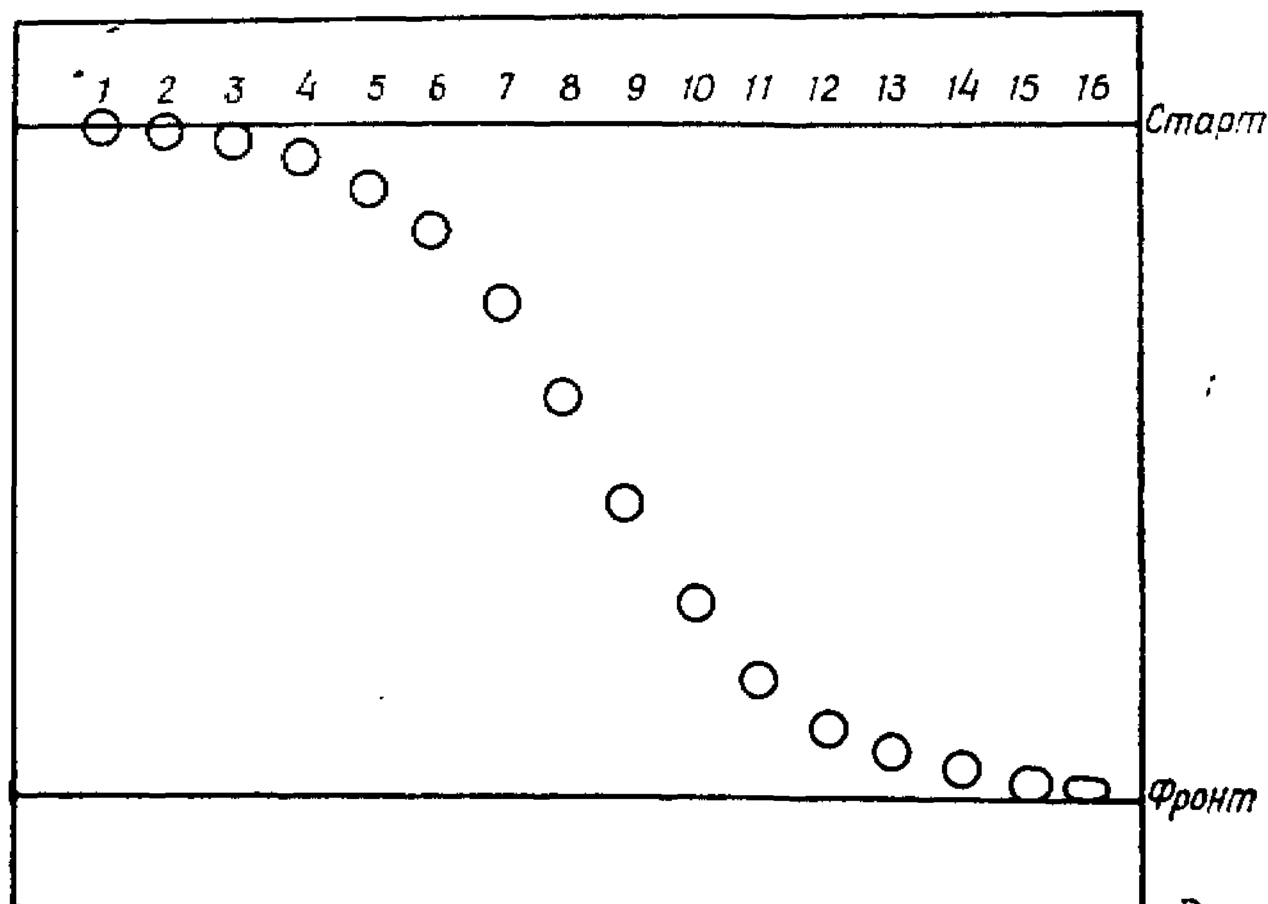


Рис. 3.17. Хроматограмма соединений одного гомологического ряда.

В данной системе растворителей (двухфазной) только у тех соединений, которые приблизительно одинаково растворимы в обеих фазах, R_f равно примерно 0,5. Все другие соединения, т. е. подавляющее их большинство, располагаются ближе к стартовой линии или фронту растворителя. Отсюда следует, что в гомологическом ряду соединений только некоторые члены имеют подходящие значения R_f. Это означает, что разности величин R_f для гомологов, отличающихся только на одну CH_2-группу, не могут быть постоянными во всем гомологическом ряду. Они достигают максимальной величины в середине хроматограммы и убывают по направлению к ее краям (рис. 3.17).

По этой причине Бейт-Смит и Уэстолл [7] ввели в распределительную хроматографию новую величину R_M, которая является функцией R_f:

$$R_M = \log(1/R_f - 1) \qquad (3.4)$$

и обладает свойством аддитивности, т. е. ее можно рассчитать, складывая инкременты (величины ΔR_M), характеризующие отдельные части молекулы. Так, например, в определенной растворяющей системе величина ΔR_M группы CH_2 остается постоянной, и, следовательно, прибавляя к величине R_M низшего гомолога величину ΔR_M, соответствующую CH_2-группе, можно рассчитать R_M высшего гомолога. Иными словами, зависимость величины R_M гомологов одного ряда от числа метиленовых групп представляет собой прямую линию. Все сказанное о метиленовой группе относится также (с некоторыми исключениями, о которых мы будем говорить ниже) и к другим функциональным группам. Таким образом, можно записать:

$$R_M = m\Delta R_M(\mathrm{A}) + n\Delta R_M(\mathrm{B}) + p\Delta R_M(\mathrm{C}) + \ldots Z, \qquad (3.5)$$

где m — число функциональных групп A в молекуле, n — число групп B, p — число групп C и т. д., а Z — так называемая константа бумаги (зависящая от свойств бумаги, растворяющей системы и условий разделения), которая имеет ту же размерность, что и R_M. Следовательно, если для определенного вещества известны величины R_M и ΔR_M (групповые константы) для различных функциональных групп, то можно рассчитать величины R_M производных этого вещества в той же хроматографической системе. Зная величину R_f, можно рассчитать величину R_M или определить ее по графику зависимости R_M от R_f. Эта же зависимость представлена в табл. 3.4. Величины групповых констант легко определить, измерив величины R_f двух соединений, молекулы которых различаются только на одну известную функциональную группу; по величинам R_f рассчитывают R_M, а вычитая одну величину R_M из другой, определяют искомую величину ΔR_M.

Чтобы рассчитать величину R_M какого-либо соединения в данной растворяющей системе, необходимо заранее знать или измерить инкременты ΔR_M всех функциональных групп, атомов и структурные инкременты (например, инкременты стерических эффектов) молекулы, а также константу Z, определить которую немного труднее [104, 105]. Обычно на практике достаточно знать инкременты ΔR_M, поскольку работа ведется или с определенной группой веществ, для которых определяют величину R_M основного скелета молекулы и принимают ее равной сумме $Z + \Sigma\Delta R_M$ для этого скелета, или, если исследуются производные, то измеряют величину R_M исходного вещества и также считают, что в нее входит Z.

Например, при хроматографировании на ватмане № 4 в системе тетрахлорид углерода — уксусная кислота — вода введение первичной гидроксильной группы в молекулу приводит к увеличению R_M на 2,1. При добавлении одной метиленовой

Таблица 3.4

Величины R_f

R_f	0,000	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006	0,007	0,008	0,009
0,00	∞	3,000	2,698	2,522	2,396	2,299	2,219	2,152	2,093	2,042
0,01	1,996	1,954	1,916	1,880	1,848	1,817	1,789	1,762	1,737	1,713
R_f	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0,0	∞	1,996	1,690	1,510	1,380	1,279	1,195	1,123	1,061	1,005
0,1	0,954	0,908	0,865	0,825	0,788	0,753	0,720	0,689	0,659	0,630
0,2	0,602	0,575	0,545	0,525	0,501	0,477	0,454	0,432	0,410	0,389
0,3	0,368	0,347	0,327	0,308	0,288	0,269	0,250	0,231	0,213	0,194
0,4	0,176	0,158	0,140	0,122	0,105	0,087	0,070	0,052	0,035	0,017
0,5	0,000	—0,017	—0,035	—0,052	—0,070	—0,087	—0,105	—0,122	—0,140	—0,158
0,6	—0,176	—0,194	—0,213	—0,231	—0,250	—0,269	—0,288	—0,308	—0,327	—0,347
0,7	—0,368	—0,389	—0,410	—0,432	—0,454	—0,477	—0,501	—0,525	—0,545	—0,575
0,8	—0,602	—0,630	—0,659	—0,689	—0,720	—0,753	—0,788	—0,826	—0,865	—0,908
0,9	—0,954	—1,005	—1,061	—1,123	—1,195	—1,279	—1,380	—1,510	—1,690	—1,996
1,0	—∞									

группы к алифатической цепи R_M в той же системе уменьшается на 0,40, а при введении гидроксильной группы увеличивается на 1,6. Изменения величин R_f совершаются в направлениях, противоположных изменениям величин R_M. Для указанной выше системы определена также константа бумаги ($Z = -0{,}60$). Таким образом, используя эти немногие данные, можно рассчитать R_f дикарбоновых кислот или гликолей, а также некоторых оксикислот. Например, с помощью формулы (3.5) можно вычислить теоретическую величину R_M янтарной кислоты:

$$R_M = 2\Delta R_M(\mathrm{COOH}) + 2\Delta R_M(\mathrm{CH_2}) + Z.$$
$$= 2(1{,}6) - 2(0{,}4) - 0{,}60$$
$$= 1{,}8.$$

Величина $R_M = 1{,}8$ соответствует [согласно формуле (3.4), см. табл. 3.4] величине $R_f = 0{,}017$.

Наконец, следует подчеркнуть, что часто наблюдаемые расхождения между теоретически рассчитанными и экспериментально определенными величинами объясняются невыполнением следующих требований: эксперимент должен носить характер чисто распределительной, т. е. жидко-жидкостной, хроматографии, он должен проводиться при фиксированных условиях, состав растворителя должен оставаться практически неизменным вдоль полоски бумаги. Кроме того, не следует забывать, что стерические взаимодействия также влияют на величину R_f. Так, например, внутримолекулярная водородная связь блокирует межмолекулярные взаимодействия функциональных групп (гидроксильных, карбоксильных, карбонильных и др.) с компонентами растворяющих систем, и поэтому почти всегда соединения с такими водородными связями характеризуются более высокими экспериментальными значениями R_f, чем соответствующие теоретическим расчетам, т. е. такие соединения становятся как бы более липофильными.

Поскольку функция R_M линейна, или аддитивна, интересно установить можно ли ее использовать для выяснения структуры органических соединений, например для определения наличия или числа определенных функциональных групп в молекуле. Прежде всего следует указать, что Буш [18] расширил понятие R_M. Буш различает три типа инкрементов ΔR_M: $\Delta R_M(g)$, $\Delta R_M(r)$, $\Delta R_M(s)$. Первый тип — это величины, рассмотренные выше, причем индекс g означает «функциональная группа» (group). Индекс величин второго типа r означает определенную реакцию (reaction), приводящую к определенному изменению структуры молекулы, которое вызывает изменение величины R_M исходных веществ на $\Delta R_M(r)$. Например, возможно ацетилирование гидроксильной группы, или восстановление оксогруппы

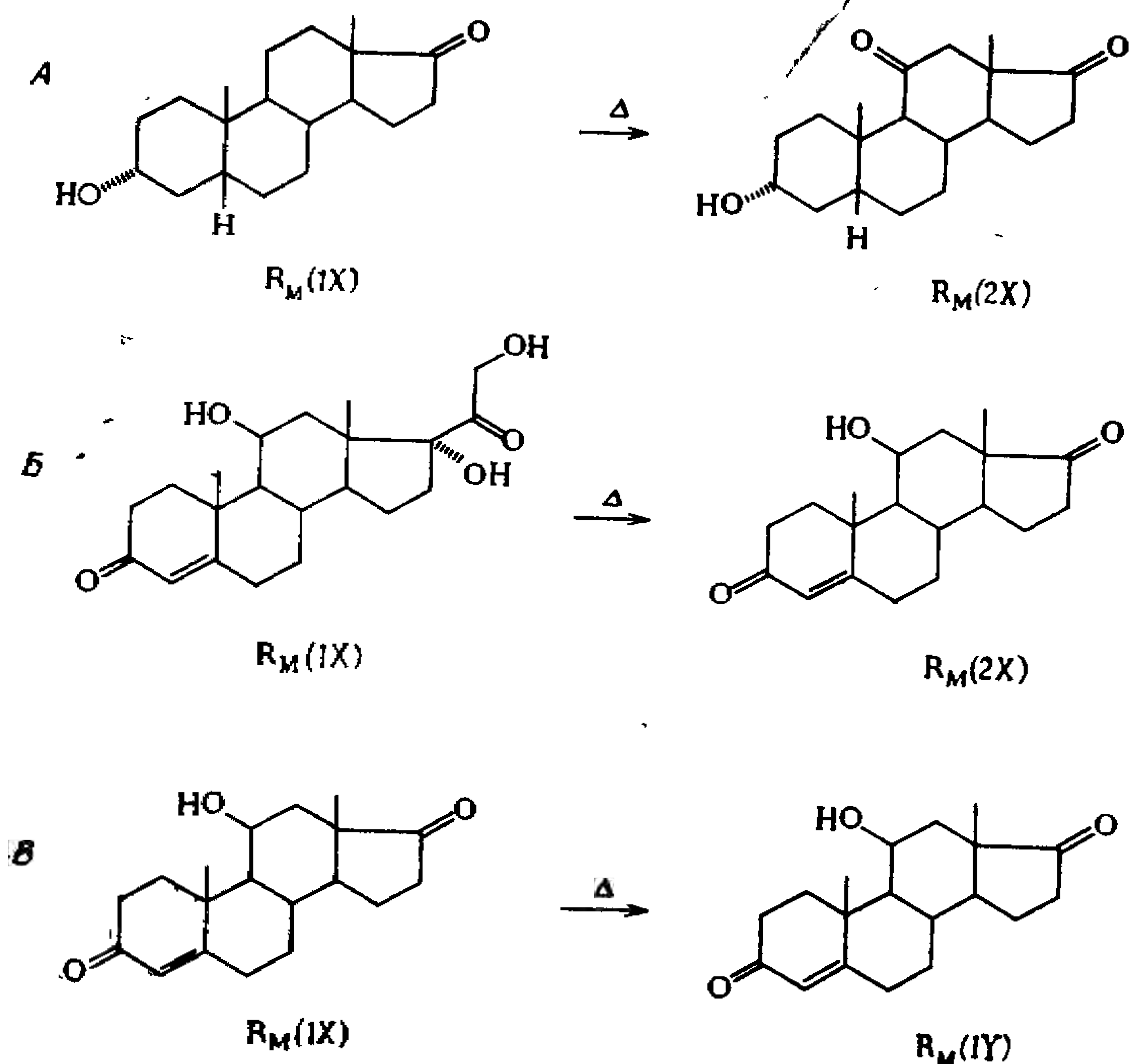


Рис. 3.18. Схемы, поясняющие смысл величин $R_M(g)$, $R_M(r)$ и $R_M(s)$.

А: $R_M(g) = R_M(2X) - R_M(1X)$, где g — оксогруппа при С-11

Б: $R_M(r) = R_M(2X) - R_M(1X)$, где r — реакция окисления $NaBiO_3$

В: $R_M(s) = R_M(1X) - R_M(1Y)$, где s — изменение при переходе от хроматографической системы X к хроматографической системе Y.

до гидроксильной группы, или обратная реакция. Это означает, что, если известна величина $\Delta R_M(r)$ для перехода $—OH \longrightarrow —OCOCH_3$ (ацетилирование), то можно рассчитать величины R_M ацетатов веществ, содержащих одну или даже большее число подобных гидроксильных групп. Наконец, установлено, что величины R_M, а следовательно, и ΔR_M изменяются правильным и одним и тем же образом при переходе от одной растворяющей системы к другой. Эти изменения обозначены как $\Delta R_M(s)$, где индекс s означает растворитель или систему (solvent, system). Определение величин $\Delta R_M(s)$ особенно полезно в том случае, когда применяют две растворяющие системы, для которых величина $\Delta R_M(s)$ какой-либо данной функциональной группы или реакции исключительно велика по сравнению с $\Delta R_M(s)$ других функциональных групп. Чтобы читателю легче было понять изложенное, мы приведем примерную схему, отражающую концепцию Буша (рис. 3.18), и в табл. 3.5 укажем соответствующие величины $\Delta R_M(g)$.

Таблица 3.5

Приближенные значения некоторых групповых констант $\Delta R_M(g)$ для различных растворяющих систем[а] [87]

Состав растворителя	C_2H_5OH—NH_4OH—H_2O (80 : 4 : 16)	*изо*-C_3H_7OH—NH_4OH—H_2O (10 : 1 : 1)	Насыщенный водой фенол+0,1% купрона[б]	*н*-C_4H_9OH—CH_3COOH—H_2O (4 : 1 : 5)	$C_5H_{11}OH$—5 н. HCOOH (1 : 1)	$CH_3COOC_2H_5$—CH_3COOH—H_2O (3 : 1 : 1)	Насыщенный водой бутилацетат	CCl_4—CH_3COOH (100 : 2)	$CHCl_3$—$HCONH_2$[в]	Петролейный эфир (100 : 4)
Бумага и направление элюирования	W54 нисходящее	W1	W1 нисходящее	W4	W1, нисходящее	SS2043b, восходящее	W4, нисходящее	W4, нисходящее	W2, нисходящее	W4, нисходящее
Z	—0,43		—0,57	—0,26	—0,97	—1,02	—0,49	—0,60		
—CH_2—	—0,08	—0,16	—0,27	—0,20	—0,12	—0,21	—0,33	—0,40	—0,46	—0,21
—CO—		0,60			0,39[г]			1,51	1,35	1,63
Разветвление цепи	—0,05		0,07	0,04	—0,14[д]	—0,02[д]	0,82			
—NH_2	0,24[е]		0,39[е]	0,20[е]	1,65[е]	1,36[е]				
—OH (первичная)	0,20	0,76	0,36	0,22—0,37	0,73		1,2	2,18	1,71	1,98
—OH (вторичная)	0,13		0,38		0,50	0,46		1,86	1,5	
—OH (фенольная)		0,23	0,91	0,36			1,0	2,31	1,82	
	0,56		1,07				0,68	1,6		

[а] Групповые константы для метиленовых и карбоксильных групп приведены также в табл. 3.2.
[б] Купрон — α-бензоиноксим.
[в] Бумага, пропитанная формамидом.
[г] α-Кетогруппа (по отношению к карбоксилу).
[д] Исправленные литературные данные.
[е] α-Аминогруппа (по отношению к карбоксилу).
[ж] Рассчитано по значениям ΔR_M *н*-бутиламина и 1,4-диаминобутана.
[з] Гидроксильная группа в α-положении по отношению к аминогруппе.

Основываясь на рассмотренной системе, Хоу [58] разработал метод хроматографического определения числа карбоксильных групп в молекулах кислот. Он использовал две растворяющие системы: 1) *н*-пропиловый спирт — аммиак (7 : 3) и 2) *н*-пропиловый спирт — сернистая кислота (7 : 3). В составе растворяющих систем использовались летучие основания и кислоты, ко-

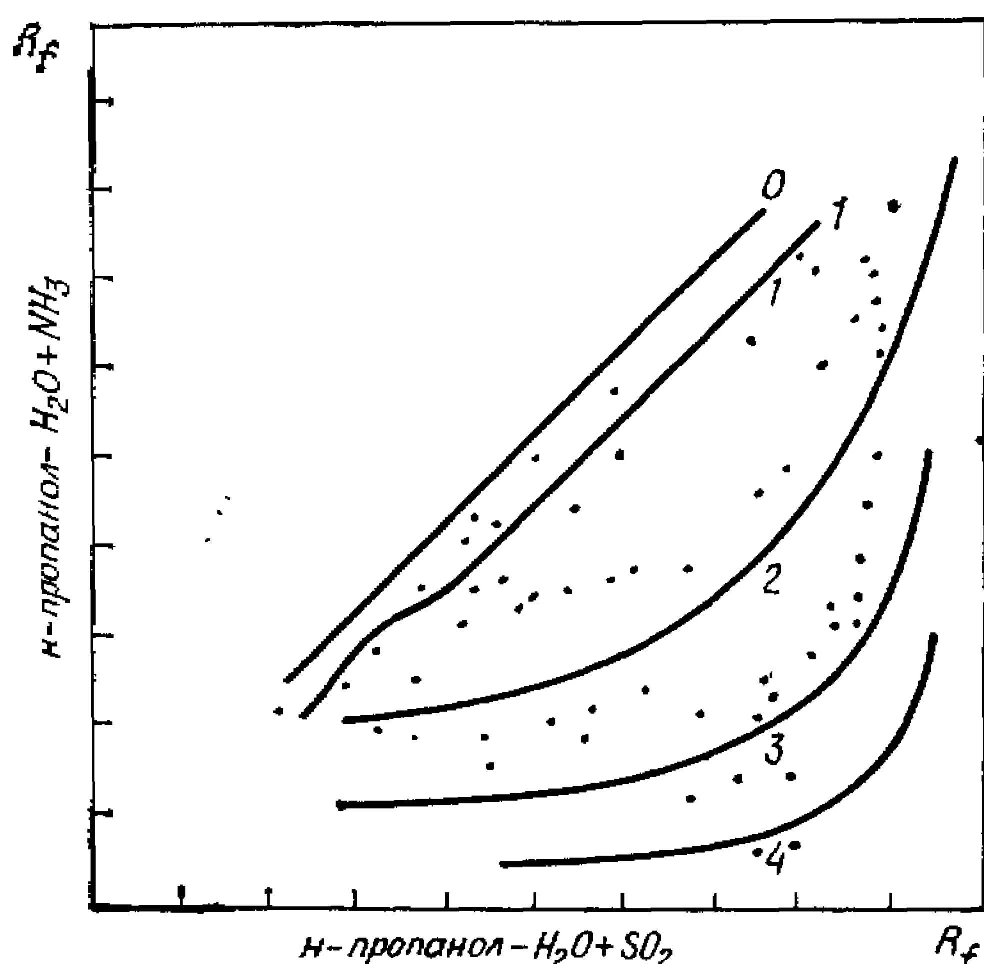


Рис. 3.19. Распределение карбоновых кислот на графике зависимости величин R_f кислот, полученных в основной системе, от величин R_f тех же кислот, полученных в кислотной системе [58].

0 — зона нейтральных соединений; *1* — зона одноосновных кислот; *2* — зона двухосновных кислот; *3* — зона трехосновных кислот; *4* — зона четырех- и многоосновных кислот.

торые легко испаряются при сушке хроматограмм; благодаря этому можно затем применять растворы индикаторов для обнаружения пятен кислот. Измерив величины R_f большого числа кислот в этих системах, Хоу построил кривые изменения R_f в кислой системе в зависимости от величин R_f в щелочной системе и в результате получил зоны монокарбоновых (*1*), дикарбоновых (*2*) и трикарбоновых (*3*) кислот и кислот с более высоким содержанием карбоксильных групп. Нейтральные вещества располагаются на этой диаграмме, как и предполагалось, по диагонали (рис. 3.19). Таким образом, достаточно измерить величины R_f неизвестного вещества в двух указанных системах и установить, в какую зону диаграммы оно попадает, чтобы определить, сколько карбоксильных групп содержится в молекуле этого вещества. Положение немного усложняется, если анализируются амфотерные соединения, однако и в этом случае при определенных условиях можно применять указанный метод.

Примеры применения методов, основанных на анализе величин R_M, можно найти в монографии Буша [18], статьях Прохазки [103—105], а также в монографиях по БХ.

3.2. ТЕХНИКА РАБОТЫ

3.2.1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРОБЫ

Если посредством БХ надо установить наличие какого-то соединения в исследуемом материале, то очевидно, что концентрация этого соединения в пробе не должна быть слишком низкой, т. е. содержание его в нанесенной пробе не должно быть ниже предела его обнаружения. В равной мере ошибочно наносить слишком большое количество вещества или слишком большую пробу, содержащую также большие количества других веществ, так как при этом может исказиться характер перемещения фронта растворителя и в результате могут измениться величины R_f или у пятен могут образоваться хвосты. Поэтому, если проба слишком разбавлена или содержит много примесей, ее надо предварительно концентрировать или очистить от примесей. Это можно сделать с помощью обычных химических методов или методов разделения, например селективной экстракции, фильтрации через хроматографическую колонку (иногда с использованием ионообменников), обессоливанием и т. п. Мы рассмотрим лишь несколько широко применяемых методов.

Нейтральные вещества можно отделить от кислот или оснований, фильтруя пробу через ионообменники. Содержащиеся в водных растительных экстрактах алкалоиды можно концентрировать следующим образом. Подкисляя экстракт, сначала получают их сильно гидрофильные соли, затем экстрагируют липофильные компоненты межклеточного вещества органическим растворителем, например хлороформом, далее переводят свободные основания алкалоидов в щелочную форму и экстрагируют их хлороформом. Подобным образом можно повысить содержание липофильных кислот, но при этом кислотную обработку и перевод в щелочную форму проводят в обратном порядке. Для концентрирования ряда соединений можно использовать большинство видов колоночной хроматографии((хроматографической фильтрации). При работе с сухим исходным материалом экстракцию обычно ведут в аппарате Сокслета растворителями различной полярности. Например, в результате фильтрации водных растительных экстрактов в колонке, заполненной порошкообразным полиамидом, удерживаются соединения фенольного типа, а другие растворимые в воде соединения, например сахара, аминокислоты и т. п., проходят через колонку. Оставшиеся в колонке соединения можно элюировать мета-

нолом или щелочными растворами. При хроматографировании на бумаге чрезвычайно мешает наличие избытка неорганических солей, поэтому были разработаны различные типы приборов для обессоливания, в которых используется принцип электродиализа (см. [30, 146], а также [50]). Позднее для обессоливания стали применять гель-хроматографию.

Белки в пробе можно коагулировать, например нагреванием. Липиды, воски, парафины и другие липофильные соединения удается отделить от гидрофильных компонентов методом экстракционного разделения между фазами петролейного эфира и водных спиртов (например, 60- и 95%-ного метанола в зависимости от природы веществ) в одной делительной воронке или в нескольких, применяя метод противоточного распределения. Различные виды аминокислот (основные, кислые и нейтральные) можно предварительно разделить посредством электрофореза на бумаге или в геле. Для отделения различных органических кислот и ряда соединений типа фенолов от сахароподобных веществ пригодны даже такие старые методы, как осаждение ацетатом свинца, основным ацетатом свинца и т. п. Некоторые группы алкалоидов можно высадить из экстрактов с помощью специфических реагентов, а затем выделить их. В тех случаях, когда представляют интерес органические вещества средней полярности, можно иногда очистить пробу непосредственно на бумаге, на которой должен проводиться хроматографический анализ. Неочищенную пробу хроматографируют сначала чистым петролейным эфиром (иногда несколько раз), липиды при этом перемещаются вместе с фронтом растворителя. Далее хроматограмму сушат, после этого можно хроматографировать пробу еще раз чистой водой, если целевое вещество полностью нерастворимо в ней. Вода вымывает из пробы соли, сахара, аминокислоты и т. д., которые перемещаются вместе с фронтом элюента или вблизи него. В заключение пробу хроматографируют специально подобранным элюентом, следя при этом, чтобы фронт растворителя не продвинулся на такое же расстояние, как при предыдущих операциях по очистке.

Лучше всего провести предварительное хроматографирование, которое подскажет, надо ли пробу концентрировать или разбавлять, не слишком ли много в ней межклеточного вещества, какие типы примесей в ней имеются, какова полярность анализируемых веществ и какая система растворителей предпочтительна.

3.2.2. НАНЕСЕНИЕ ПРОБЫ

Раствор анализируемой смеси веществ (т. е. пробу) наносят калиброванной микропипеткой в виде пятен на стартовую линию листа хроматографической бумаги. При этом необходимо

следить, чтобы пятна не получались ни слишком большими, ни слишком маленькими. Если пятна слишком велики, поверхностная концентрация (мкг/см^2) некоторых компонентов может быть ниже предела обнаружения, и в результате такие компоненты не удастся обнаружить. Если диаметр пятна слишком мал, концентрация компонента может оказаться слишком высокой, так что количество растворителя, приходящееся на площадь пятна, будет недостаточным для полного растворения пробы, и это обязательно вызовет удлинение пятен.

Общепринято наносить пробу в виде круглых пятен, но если необходимо особенно четкое разделение, то лучше нанести пробу в виде тонкой полоски или линии. При использовании некоторых приемов хроматографирования, например при пропитке бумаги, можно нанести пробу в виде пятна, а затем дать пропитывающему раствору подняться до стартовой линии, погружая хроматограмму в пропитывающий раствор сначала по одну, а затем по другую сторону от стартовой линии. В результате проба окажется сконцентрированной на стартовой линии в виде узкой полосы.

3.2.3. ОБРАЩЕНИЕ С ХРОМАТОГРАММАМИ И ЭЛЮИРОВАНИЕ ИХ

После нанесения пробы хроматограмму вкладывают в хроматографическую камеру и начинают элюирование. При этом необходимо знать, какое количество вещества неподвижной фазы содержится в подвижной фазе, которая используется для элюирования. Гидрофильные элюенты, чаще всего на основе бутанола, или даже однофазные элюенты (например, смесь изопропиловый спирт — вода) содержат такое количество воды, что в ходе элюирования бумага может впитать из них необходимую воду и набухнуть. В этом случае хроматографирование можно начинать немедленно и получить в результате пятна также правильной круглой формы; это обстоятельство доказывает, что разделение происходит по принципу распределительной хроматографии. Однако, если содержание воды в подвижной фазе невелико, ниже примерно 10% (а это имеет место при использовании таких систем, как бутилацетат — вода, бензол — пропионовая кислота — вода, тетрахлорметан — уксусная кислота — вода, системы Буша и др.), необходимо до начала элюирования ввести в бумагу требуемое количество полярной неподвижной фазы. С этой целью бумагу выдерживают над водой в камере с влажной атмосферой (приведение в равновесие), обрабатывают ее водяным паром, опрыскивают мелкодисперсным аэрозолем, содержащим вещества неподвижной фазы, или пропитывают влажным эфиром по методу Буша и Кроушоу [19].

В последнем случае сначала наносят пробу на полоску бумаги, которую после этого смачивают, пропуская через смесь диэтилового эфира, метанола и воды (в соотношении 80:16:4 или 63:25:12 соответственно при высокой или низкой влажности воздуха) и следя за тем, чтобы в эту смесь не погружалась та часть бумаги, где находится стартовая линия. Полоску бумаги погружают сначала с одной, а затем с другой стороны от стартовой линии и дают пропитывающей смеси подняться вплотную к стартовой линии; при этом зоны или пятна, нанесенные на стартовую линию, обычно сужаются. По окончании разделения полоски подвешивают в вытяжном шкафу на 1—5 мин, пока не улетучатся органические растворители вместе с избытком влаги, и после этого кладут на металлическую рамку, показанную на рис. 3.7. Часть бумаги под стартовой линией (при восходящем хроматографировании) отгибают, помещают в лоток и закрепляют там при помощи тяжелой стеклянной палочки. Далее закрепленную хроматограмму помещают в стеклянную камеру, которую затем закрывают. Подвижную фазу наливают в лоток через отверстие в крышке камеры по истечении 5 мин. Такая выдержка необходима для восстановления в камере равновесия, которое обычно нарушается, когда камеру открывают. Этих нескольких минут вполне достаточно для полного испарения эфира и почти полного испарения метанола, так что в порах бумаги остается только вода, которая быстро абсорбирует другой компонент неподвижной фазы. Таким образом, хроматографирование можно начинать уже через 5 мин. Описанная методика делает ненужной применявшуюся ранее процедуру приведения в равновесие бумаги с нанесенной пробой и элюента. В соответствии с прежней методикой полоску выдерживали в атмосфере паров системы растворителей не менее 3 ч (от 3 до 16 ч).

Другой метод увлажнения бумаги, применяемый при использовании сильнолетучих липофильных растворителей, состоит в опрыскивании бумаги (с уже нанесенными пробами) мелкодисперсным аэрозолем водного 50—80%-ного метанола или водной 30%-ной уксусной кислоты. Сначала опрыскивают бумагу таким образом, чтобы придать ей явно влажный вид, но при этом она не должна выглядеть так, как будто ее погружали в жидкость. Далее ее сушат в вытяжном шкафу, пока не исчезнет облачко, вызванное не вполне однородным опрыскиванием, и бумага не будет выглядеть сухой, оставаясь, однако, влажной и мягкой на ощупь. После этого хроматограмму помещают в камеру, выдерживают ее там 5 мин и затем наливают элюент в лоток.

Неподвижную водную фазу можно также нанести на сухую бумагу, выдерживая ее в парах кипящей воды, например по-

местив хроматографическую полоску над плоской чашкой, в которой кипит вода. Когда под действием водяного пара бумага станет заметно мягкой и влажной, надо сразу же поместить ее в камеру и после короткой, 5—10-минутной выдержки начать элюирование.

При работе с неполярными растворителями бумагу часто пропитывают неводной неподвижной фазой. С этой целью чаще всего используют формамид, диметилформамид и пропиленгликоль. Применяются также диметилсульфоксид и другие малолетучие полярные органические растворители. Пропитку проводят перед или после нанесения пробы (см. выше). Если бумагу пропитывают несколько более летучим растворителем перед нанесением пробы, то рекомендуется открыть только ту часть бумаги, где находится стартовая линия и наносить пробу на стартовую линию в этой части как можно быстрее, закрыв остальную часть бумаги стеклянной пластинкой или алюминиевой фольгой и т. п., чтобы помешать испарению пропитывающего агента.

При хроматографировании таких липофильных веществ, которые в обычных растворяющих системах перемещаются вместе с фронтом растворителя, целесообразно применять обращенно-фазные системы. С этой целью бумагу пропитывают неполярным липофильным растворителем и проводят элюирование полярным растворителем. В обращенно-фазных системах наблюдается обратный порядок изменения величин R_f разделяемых соединений, т. е. более липофильные компоненты перемещаются медленнее и остаются ближе к стартовой линии, в то время как менее липофильные компоненты перемещаются быстрее.

В этом случае бумагу пропитывают следующим образом. Помещают ее в плоскую чашку, или лоток, или на большое часовое стекло и обрызгивают раствором пропитывающей жидкости в очень летучем растворителе. Для пропитки формамидом (который чаще всего применяется) лучше всего использовать смесь формамида и этилацетата в соотношении 3 : 7, ацетон более летуч, но менее пригоден из-за своей нестойкости, а этанол еще менее пригоден, так как мало летуч. Для пропитки керосином при образовании обращенно-фазных систем рекомендуется смесь керосина (т. кип. 200—250 °С) и петролейного эфира (т. кип. 40—60 °С) в соотношении 4 : 6. В пропитывающий раствор погружают полоску хроматографической бумаги, на которой карандашом отмечена стартовая линия. Сразу после этого кладут смоченную бумагу между двумя листами фильтровальной бумаги и удаляют избыток пропитывающего раствора, прижимая все три листа друг к другу, например разглаживая верхний лист рукой или резиновым валиком. Дают все еще влажной хроматограмме свободно подсохнуть на воздухе, чтобы

испарился разбавитель. После этого опять помещают полоску между двумя листами бумаги (чтобы избежать избыточного испарения пропитывающего агента), оставляя открытой стартовую линию, на которую наносят пробы. Нельзя растворять пробы в таком растворителе, в котором растворим пропитывающий агент; в этом случае он будет вымываться со стартовой площади. В результате там не останется неподвижной фазы и может произойти частичная адсорбция пробы на сухой бумаге, а также может нарушиться нормальное течение элюента по бумаге, что приведет к ухудшению разделения. Однако если нельзя подобрать растворитель, который не растворял бы пропитывающее вещество (как, например, при пропитке формамидом, если пробы нерастворимы в хлороформе, бензоле или менее полярных растворителях, а растворимы только в метаноле, этаноле и т. п.), то надо наново пропитать площадь около стартовой линии, откуда при нанесении проб был вымыт пропитывающий агент. С этой целью на хроматограмму наносят с помощью капилляра раствор пропитывающего агента и дают разбавителю испариться, затем помещают бумагу в лоток, выдерживают несколько минут и начинают элюирование.

На практике применяют различные виды элюирования: восходящее, нисходящее, горизонтальное, круговое (центрифужное). При нисходящем хроматографировании следует тщательно уложить край бумаги в лоток и прижать ее тяжелой стеклянной палочкой или узкой пластинкой, чтобы бумага не могла соскользнуть в процессе элюирования. Во время работы не следует касаться бумаги пальцами, особенно если хроматографируются аминокислоты. Закрепленную в лотке полоску или лист бумаги помещают на подставку внутри камеры, закрывают камеру крышкой и выдерживают в атмосфере паров неподвижной фазы в течение определенного времени — от 5 мин до 16 ч, т. е. до следующего дня. При работе с сильно летучими растворителями типа растворителей Буша (см. разд. 3.5.6 «Стероиды и терпеноиды») бумагу следует выдерживать над неподвижной фазой не менее 3 ч, а лучше до следующего дня, если неподвижная фаза не наносилась на бумагу посредством одного из указанных выше методов. По окончании выдержки наливают в лоток подвижную фазу и дают ей передвигаться в бумаге под действием капиллярных сил почти до самого края. После этого осторожно вынимают хроматограмму из камеры, сразу же отмечают положение фронта растворителя и дают листку высохнуть. При работе с большими листами удобно пользоваться специальными широкими щипцами.

Если вещества имеют в данной системе очень низкие значения R_f, можно использовать метод *непрерывной* (*проточной*) *хроматографии*. Нижнему краю бумаги с помощью ножниц при-

дают пилообразную форму и дают растворителю по каплям стекать с хроматограммы на дно камеры в течение требуемого промежутка времени. Конечно, если разделяемые вещества бесцветны, то нельзя видеть, где они находятся на хроматограмме, и если в этих случаях применяют проточное хроматографирование, то вместе с пробой надо хроматографировать соответственно подобранное окрашенное стандартное вещество, чтобы видеть, как перемещаются разделяемые вещества. После элюи-

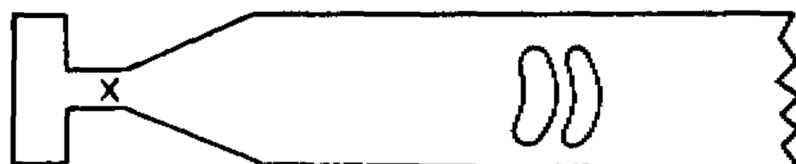


Рис. 3.20. Хроматографическое разделение на полоске клиновидной формы.

рования и сушки хроматограммы на ней можно проводить обнаружение и другие операции, а также можно еще раз провести хроматографирование в той же или другой растворяющей системе, чтобы добиться лучшего разделения. Этот способ хроматографирования называется *многократным элюированием*.

Проточное и многократное элюирование, особенно на полосках клиновидной формы,— наиболее эффективные методы разделения плохо разделяемых веществ. Если два вещества не разделяются при однократном элюировании (даже при значениях R_f этих веществ около 0,5), надо выбрать такую растворяющую систему, в которой величины R_f разделяемых веществ будут ниже 0,1. Затем надо нанести эти вещества на хроматограмму клиновидной формы (таким образом, в начальной стадии процесса совершается круговое хроматографирование, приводящее к сужению зон) и на этой хроматограмме провести проточное или многократное хроматографирование (рис. 3.20).

Восходящее хроматографирование происходит немного медленнее, но растворитель в этих условиях не может «стечь» с хроматограммы. Когда фронт растворителя достигает верхнего края бумаги, он останавливается, если камера герметически закрыта, а атмосфера в ней насыщена парами; если эти условия не выполнены, то растворитель испаряется с верхней части бумаги внутрь камеры и при этом вещество постепенно накапливается вблизи и на линии фронта растворителя. Одновременно из-за диффузии пятна расплываются, так что их диаметр увеличивается и в результате ухудшается и разделение, и эффективность обнаружения.

Круговая хроматография в настоящее время применяется довольно редко несмотря на то, что обеспечивает четкое разделение. Дело в том, что разделение указанным способом идет

очень медленно и, кроме того, сравнение величин R_f также затруднено. То же самое можно сказать и о центрифужной хроматографии.

3.2.4. СУШКА

Элюированные в летучих растворителях хроматограммы свободно подвешивают для сушки на воздухе, лучше всего в вытяжном шкафу или в токе воздуха под вытяжным колпаком. При использовании малолетучих растворителей (например фенола, коллидина) или бумаги, пропитанной формамидом или пропиленгликолем, лучше всего сушить хроматограммы в сушильном шкафу с циркуляцией воздуха. Если хроматографируемые вещества достаточно термостойки, хроматограммы можно сушить над нагревательной плиткой. Когда для обнаружения используют индикаторы, надо специально проследить, чтобы с бумаги испарился весь кислотный или основный растворитель, входящий в состав обнаруживающего реагента, а также чтобы сушка хроматограмм проводилась в нейтральной атмосфере. Соляную кислоту нельзя удалить с бумаги полностью. Удаление следов уксусной кислоты с хроматограмм можно ускорить, если подержать хроматограммы горизонтально над паром, идущим от плоской чашки с кипящей водой, или обдувать их горячим паром.

Формамид часто оставляет на бумаге следы формиата аммония и других примесей, которые нельзя удалить и которые мешают обнаружению некоторыми реагентами, например хлоридом сурьмы(III).

3.2.5. ОБНАРУЖЕНИЕ

Окрашенные вещества обычно видны на хроматограммах в виде четко различимых пятен. Бесцветные вещества часто флуоресцируют или подавляют флуоресценцию. Если разделенные компоненты нельзя обнаружить ни одним из указанных способов, можно попытаться воспользоваться реагентами, дающими цветные реакции с этими компонентами. С этой целью можно или опрыскивать хроматограмму соответствующим реагентом из пульверизаторов различной конструкции (см. рис. 3.11), или погрузить бумагу в раствор реагента, конечно, если анализируемые соединения не растворяются в нем. После обработки реагентом хроматограмму обычно сушат и нагревают в течение определенного промежутка времени. Это можно делать в сушильном шкафу, или под лампой с инфракрасным излучением, или двигая полоску горизонтально над нагревательной плиткой и т. п. Поскольку для сушильных шкафов обычно требуется

много места и они корродируются испаряющимся реагентом, рекомендуется установить непосредственно в вытяжном шкафу батарею из 2—4 ламп с инфракрасным излучением и под ними сушить хроматограммы до и после обработки обнаруживающим реагентом.

Специфические реагенты указаны в соответствующих разделах этой главы, а также в разд. 9.9 гл. 9, где дан список обнаруживающих реагентов. В этом разделе мы приведем лишь несколько общих неспецифических реагентов.

Пары иода (или раствор иода в петролейном эфире) вступают в неспецифическую реакцию с различными соединениями главным образом потому, что из-за более липофильного характера этих соединений по сравнению с целлюлозой иод лучше растворим в них, и в результате этой реакции соединения окрашиваются в желтый или коричневый цвет. Алкалоиды и вообще третичные и четвертичные амины, взаимодействуя с иодом, образуют темно-коричневые пятна. Некоторые вещества дают с иодом чернильно-синие пятна (подобные пятну комплекса иода с крахмалом), особенно если хроматограмма надлежащим образом смочена.

Подкисленный или подщелоченный перманганат калия окисляет очень многие соединения, образуя при этом пятна от желтой до белой окраски на фиолетовом фоне хроматограмм. После сушки фон становится коричневым, а через несколько суток даже исчезает. Для обнаружения веществ кислотного или основного характера также пригодны кислотно-основные индикаторы в водном или спиртовом растворе. Раствором динитрофенилгидразина обнаруживают вещества, содержащие карбонильную группу. В частности, с ним интенсивно реагируют ароматические альдегиды и кетоны. Раствор нингидрина — очень чувствительный реагент на аминокислоты и вообще алифатические амины.

Аммиачный раствор нитрата серебра также действует как слабый окислитель и дает с различными веществами (восстанавливающие соединения, фенольные соединения, многие серусодержащие соединения и др.) пятна от оранжевого до черного цвета. Концентрированная серная кислота образует окрашенные и флуоресцирующие пятна с различными соединениями, но она разрушает бумагу, и поэтому перед опрыскиванием хроматограмму необходимо поместить на стеклянную пластинку, а в некоторых случаях закрыть ее другой стеклянной пластинкой.

Большинство ароматических аминов и фенолов можно легко обнаружить путем опрыскивания растворами солей диазония. При этом образуются азокрасители. Реагент Драгендорфа, предназначенный для обнаружения алкалоидов, реагирует с большинством соединений типа оснований, а иногда слабо вза-

имодействует с некоторыми нейтральными соединениями, например ненасыщенными кетостероидами.

Контрастное окрашивание красителями относится к числу неспецифических реакций; этот метод обнаружения также может оказаться очень полезным.

Для обнаружения различных веществ более липофильной природы, в частности каротиноидов, стероидов, тритерпенов и вообще изопреноидов, с системой сопряженных двойных связей или со способными к дегидрированию с образованием двойных связей гидроксильными группами пригоден реагент Карра-Прайса (раствор $SbCl_3$ в хлороформе). При этом часто образуются ярко окрашенные пятна.

3.2.6. ЭКСТРАГИРОВАНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ЗОН

Во многих случаях необходимо не только визуально фиксировать пятна разделенных на бумаге веществ и измерить их величину R_f, но и подвергнуть эти вещества дальнейшей обработке. Например, может понадобиться экстрагировать пятно с бумаги, чтобы провести колориметрический анализ, подвергнуть элюат масс-спектральному исследованию или провести микрохимическую реакцию и т. п. Положение пятна, если оно бесцветно, определяют путем обнаружения на контрольной полоске, содержащей вещество-стандарт и подвергнутой хроматографированию на том же листе и в тех же условиях, что и анализируемый образец. Обнаруженное пятно вырезают вместе с участком окружающей бумаги (рис. 3.13) и обрабатывают, как указано ниже.

а. Разрезанную на маленькие кусочки и находящуюся во взвешенном состоянии в чистом элюирующем растворителе бумагу экстрагируют в течение некоторого времени — если необходимо, при нагревании — и отфильтровывают экстракт. В ряде случаев эти операции повторяют несколько раз, сливают фильтраты и упаривают их. Этот метод очень прост, но расход растворителя довольно велик.

б. Бумагу несколько раз скатывают, складывают или нарезают на кусочки и помещают в микроэкстрактор непрерывного действия, где проводят экстракцию при нагревании.

в. Метод экстракции длинных поперечных зон в препаративной хроматографии описан выше (разд. 3.1.2, рис. 3.15).

г. Наиболее общий метод элюирования отдельных пятен с бумаги также описан в разд. 3.1.2 (см. также рис. 3.14). Этим методом выделяют главным образом гидрофильные соединения, которые легко экстрагируются водой. Обычно экстрагируемое соединение содержится уже в самых первых каплях воды,

стекающей с бумаги в поставленный сосуд, так что сразу получается очень концентрированный раствор.

Элюат концентрируют и затем исследуют, например проводят повторное хроматографирование, колориметрический или спектральный анализ, биологические испытания, или получают его производные, осуществляя ацетилирование, гидролиз и ряд других реакций.

3.2.7. ХРАНЕНИЕ ХРОМАТОГРАММ И ОФОРМЛЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ ДАННЫХ

При хранении хроматограмм следует иметь в виду, что очень часто окраска пятен меняется или совсем исчезает, а если проводилось опрыскивание кислотными реагентами, то бумага становится очень ломкой и при хранении разрушается иногда вместе со страницами рабочей тетради, в которой хранили эти хроматограммы. Лучше всего сохранять хроматограммы только до тех пор, пока их не скопировали фотографическим или иным способом (см. разд. 3.1.2).

Величины R_f не всегда остаются постоянными и меняются при изменении условий хроматографирования (сорт бумаги, состав растворяющей системы, влажность и насыщение атмосферы камеры и др.), поэтому вместе с анализируемой пробой необходимо наносить на стартовую линию пробу по меньшей мере одного стандартного вещества. Тогда можно сопоставлять величины R_f с этим стандартом, достигая таким образом значительно большего постоянства этих величин. Лучше всего, однако, не ограничиваться определением величин R_f разделяемых веществ, а сохранять копии хроматограмм, из которых можно извлечь и другую важную для анализа информацию, а именно данные об интенсивности, форме и размерах пятен, об их положении относительно пятен стандартных веществ и т. п.

3.3. ПРЕПАРАТИВНАЯ БУМАЖНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Применение препаративной БХ становится все более редким, так что описание ее различных методов, например chromatopile, chromatopack и др. [50, 105], а особенно тех методов, для которых требуется специальная аппаратура, носило бы характер исторического обзора. Поэтому мы ограничимся обсуждением тех методов, которые требуют сравнительно несложного аппаратурного оформления.

Для разделения 10^{-3}- или 10^{-2}-граммовых количеств веществ удобнее всего большие или толстые листы бумаги. Для этой цели нужны большие камеры с несколькими лотками. Если подобной камеры не имеется и если надо наработать 10^{-1}-грам-

мовые количества веществ, то лучше всего использовать восходящую хроматографию. Закрепить большое число широких листов бумаги на стеклянных палочках таким образом, чтобы отдельные листы не касались друг друга, т. е. отделив один от другого с помощью узких колец, надетых на те же палочки между листами, поместить сразу всю «батарею» таких листов

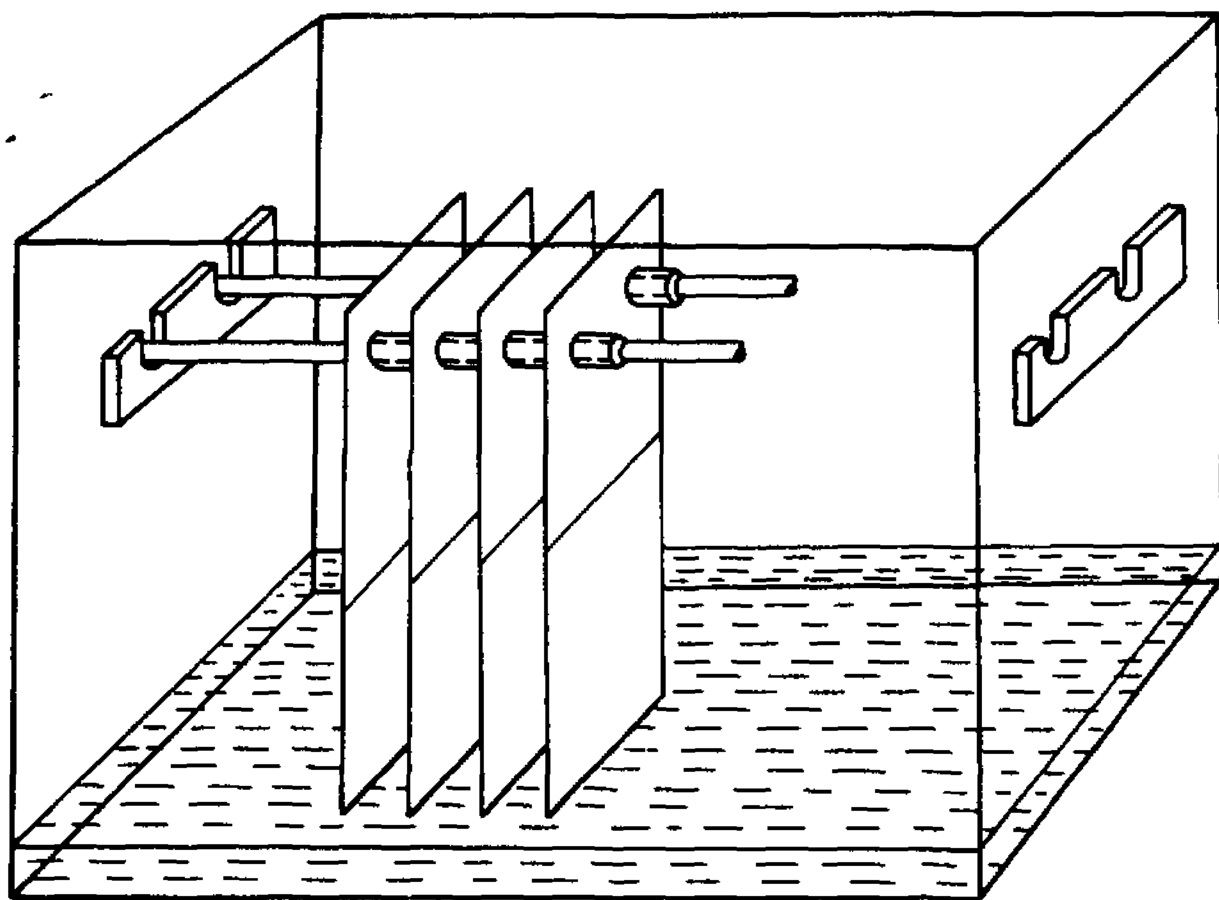


Рис. 3.21. Прибор для препаративного хроматографирования одновременно на нескольких листах бумаги.

в камеру и провести восходящее элюирование, как показано на рис. 3.21.

В настоящее время в продаже имеются такие хорошие материалы для колоночной распределительной хроматографии, что применять препаративную БХ нецелесообразно.

3.4. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ БУМАЖНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Существует несколько способов количественного анализа посредством БХ. Можно экстрагировать зоны с хроматограммы и затем провести количественный анализ методом колориметрии, флуориметрии, адсорбционной спектроскопии, полярографии, радиометрии, биологических испытаний и т. д. или сначала обнаружить вещества на бумаге путем опрыскивания, т. е. по цветной реакции, а затем экстрагировать и исследовать колориметрически. В последнем случае требуется проводить обнаружение возможно более квалифицированно, равномерно и непрерывно нанося реагент на всю хроматограмму. Только таким образом можно получить правильную калибровочную кривую. Поэтому лучше погрузить хроматограмму в обнаружи-

вающий реагент, а не опрыскивать ее. Можно также сделать пятна видимыми с помощью эффективного метода обнаружения (см. выше) и провести денситометрическое исследование их, применив подходящий денситометр. Денситометрию можно проводить в отраженном или проходящем свете. В первом случае нулевая линия (линия фона) получается более правильной; в проходящем свете бумага выглядит мутной, и поэтому нулевая линия не выходит достаточно ровной. В этом случае также необходимо строить калибровочную кривую по стандартным пробам и с ее помощью определять количество данного компонента. Вместо непосредственного денситометрического исследования можно также сфотографировать или иным подходящим способом скопировать хроматограмму и проводить денситометрирование не самой хроматограммы, а ее негативной или позитивной копии. Учитывая неоднородность (мутность) бумаги, многие авторы применяют метод просветления хроматограмм перед денситометрией, пропитывая хроматограммы парафиновым маслом. После того как денситометрирование закончено, необходимо провести оценку записанных денситометром пиков, сравнив их с пиками стандартных проб, т. е. с построенной по стандартным пробам калибровочной кривой. Иногда достаточно измерить высоту пиков, но чаще всего именно площадь между контуром пика и нулевой линией пропорциональна количеству вещества. Эту площадь можно определить планиметрированием, можно также скопировать хроматограмму, вырезать пики и взвесить их, можно также воспользоваться, как предлагают Турина и др. [131], методом Монте-Карло. Площадь пиков правильной формы можно определить расчетным путем, умножая высоту пика на его полуширину, или другим подобным методом.

Если в лаборатории не имеется денситометра, количество вещества в зоне можно определить, сравнивая ее с зонами стандартных проб. Площадь пятен оценивают визуально (полуколичественно), измеряют планиметром или накладывая на пятно миллиметровую бумагу, а если пятна большие, используют диаграммы в виде квадрата, покрытого беспорядочно расположенными точками, нанесенными на лист прозрачной бумаги [131]. Можно также скопировать эти пятна на лист однородной бумаги, вырезать и взвесить. Визуальное сравнение размеров пятен можно провести более точно, если пробу наносят на стартовую линию в виде нечетного числа точек в нескольких известных концентрациях, уменьшающихся, например, слева направо, а раствор стандартного вещества наносят на стартовую линию в возрастающих концентрациях в виде четного числа точек. Шанда усовершенствовал этот метод, повысив его точность [50]. Указанным способом удается достигнуть хорошей точности (погрешность около 3%), особенно при негативном обнару-

жении, т. е. когда обнаруживаемое вещество дает белые пятна на окрашенном фоне.

Следует также упомянуть разработанный Пильным и др. [98] количественный чисто хроматографический метод или метод электрофореза на бумаге, не требующий применения денситометра или какого-либо другого аналитического прибора. Хроматограмму фотографируют, определяя максимальное время экспозиции, необходимое для того, чтобы данное пятно не появилось на фотографии хроматограммы. Однако этот метод годится только в особых случаях, например, когда нельзя определить размер пятна визуально из-за того, что оно налагается на другое пятно.

3.5. БУМАЖНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОРОДСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ*

В первом приближении полярность и хроматографическая подвижность соединений, содержащих, кроме атомов углерода и водорода, только атомы кислорода, определяется соотношением числа атомов углерода и кислорода в молекуле. Чем выше это соотношение, тем более липофильно вещество, и наоборот (см. разд. 3.1.3). Например, у стеарилового спирта (атомарное отношение C/O=18) преобладает липофильный характер. Это соединение совсем не растворяется в воде, но легко растворяется в петролейном эфире. В то же время метиловый спирт (C/O=1) образует две фазы при смешивании с петролейным эфиром (особенно с его высшими фракциями) и полностью смешивается с водой. Другими примерами подобного рода могут служить гексиловый спирт (C/O=6) и гексозы (C/O=1). Первый плохо растворим в воде, но легко растворяется в липофильных растворителях, а для гексоз справедливо обратное. Следует однако иметь в виду, что не все кислородсодержащие функциональные группы одинаково влияют на полярность, т. е. на гидрофильность. Наиболее гидрофильна гидроксильная группа, за ней следуют альдегидные и кетонные группы, а далее кислород простых или сложных эфиров. Карбоксильная группа по своей полярности подобна гидроксильной, однако она несколько менее гидрофильна в кислотных липофильных системах, тогда как в основных растворителях ее вклад в гидрофильность молекулы значительно больше, потому что она переходит в карбоксилат-анион, который, конечно, значительно более полярен.

---

* Способы приготовления наиболее важных обнаруживающих реагентов для БХ и ТСХ описаны в перечне обнаруживающих реагентов в гл. 9. Ниже эти реагенты обозначены буквами «ОР» с дефисом и номером, соответствующим номеру в этом перечне.

Соединения с простыми эфирными группами обнаруживаются значительно труднее, чем соединения со сложными эфирными и гидроксильными группами или с двумя и тремя гидроксильными группами, если только это не вицинальные группы. Соединения с енольными группами обнаруживаются (индикаторами $FeCl_3$) легче, чем соединения с фенольными группами (связыванием диазониевыми солями, $FeCl_3$), карбонильными и карбоксильными и двумя вицинальными гидроксильными группами.

Ниже мы приведем примеры разделения и обнаружения кислородсодержащих соединений, в которые входят отдельные группы.

3.5.1. СПИРТЫ

Большинство низших алифатических спиртов представляет собой летучие соединения, которые нельзя хроматографировать непосредственно на бумаге. Поэтому их обычно переводят в производные, например 3,6-динитрофталаты, 3,5-динитробензоаты, *N,N*-диметил-*п*-аминобензолазобензоаты, ксантаты, которые легко поддаются обнаружению (табл. 3.6). Высшие алифатические спирты нелетучи, но обычно настолько липофильны, что их можно хроматографировать только в обращенно-фазных системах. Основная трудность в хроматографии этих соединений — их обнаружение. Для этого пригодны далеко не все реагенты. Высшие алифатические спирты можно обнаружить посредством контрастного окрашивания родамином В (ОР-11); их легко перевести в производные, например аллилуретаны, и обнаруживать в виде производных [64].

Получение 3,5-динитробензоатов [13, 87]. Раствор пробы, содержащий в 10 мл 5—50 мг спирта, смешивают с 0,1 мл пиридина и 1 мл бензола, охлаждают смесь льдом и добавляют последовательно 11 г карбоната калия и раствор 0,5 г 3,5-динитробензоилхлорида в 2 мл бензола. Этот раствор следует вводить осторожно и затем встряхивать смесь в течение 3 мин. После этого добавляют 30 мл эфира, не содержащего спирта, и продолжают встряхивание еще 10 мин. Отделяют эфирный слой, а оставшуюся водную фазу дополнительно дважды экстрагируют порциями эфира по 20 и 10 мл. Слитые вместе экстракты промывают 10 мл 1%-ной серной кислоты и водой и упаривают, остаток наносят на хроматограмму и элюируют.

Безводные спирты (5—50 мг) растворяют в 5 мл бензола, добавляют 50 мг 3,5-динитробензоилхлорида и 0,3 мл пиридина и в течение часа кипятят в колбе с обратным холодильником. После охлаждения дважды экстрагируют смесь 20%-ным раствором NaOH, затем водой, 5%-ной серной кислотой и опять

Таблица 3.6

Величины R_f ряда производных алифатических спиртов

Исходный спирт	3,5-ДНБ[а]	Ксантаты[б] [43, 63]	ДМАББ[в]
Метиловый	0,21	0,24	0,82
Этиловый	0,40	0,35	0,76
н-Пропиловый	0,50	—	0,65
Изопропиловый	0,52	0,45	0,67
н-Бутиловый	0,64	0,56	0,55
Изобутиловый	—	0,55	0,58
Амиловый	—	—	0,43
Изоамиловый	0,72	0,63	—
н-Гексиловый	0,79	—	0,32
Гексен-3-ол-1	0,69	—	—
н-Гептиловый	—	—	0,23
н-Октиловый	—	—	0,16
н-Нониловый	—	—	0,10
н-Дециловый	—	—	0,07
Лауриловый	0,92	—	—

[а] 3,5-ДНБ: 3,5-динитробензоаты; бумага SS 2043b, пропитанная 50%-ным раствором диметилформамида в ацетоне; подвижная фаза — насыщенный диметилформамидом декалин; нисходящее элюирование.

[б] Непропитанная бумага; подвижная фаза — насыщенный 2%-ным водным раствором КОН *н*-бутанол; восходящее элюирование.

[в] ДМАББ: N,N-диметил-*п*-аминобензолазобензоаты. Бумага, пропитанная 10%-ным раствором парафинового масла в пентане; обращенно-фазная система: подвижная фаза — смесь диметилформамид — вода (4 : 1).

водой (по 5 мл каждого экстрагента). После такой обработки бензольный слой упаривают и остаток хроматографируют.

Получение ксантатов [39, 63]. К нескольким каплям спирта, помещенным в узкую пробирку, добавляют 0,5 мл чистого CS_2 и 0,1 г чистого измельченного КОН, смесь встряхивают несколько минут, декантируют жидкую фазу, а оставшийся ксантат растворяют в капле воды и хроматографируют. При УФ-облучении ксантаты обнаруживаются в виде коричневых пятен. Их можно также обнаружить реагентом Грота (для серусодержащих соединений; см. разд. 3.7.1) или 10%-ным раствором сульфата никеля.

Получение N,N-диметил-п-аминобензоазобензоатов [25]. В микропробирке смешивают 1 мг N,N-диметил-*п*-аминобензол-

азобензоилхлорида, 2—5 мкл спирта, 1 каплю пиридина и 0,3—0,5 мл бензола. Смесь нагревают, пока не растворится этерифицирующий реагент, после чего кипятят в колбе с обратным холодильником. Средние и высшие спирты кипятят несколько минут в запаянной микропробирке, погруженной в баню с кипящей водой; реакция заканчивается за 5—10 мин, а с низшими спиртами она идет почти мгновенно. Образовавшиеся производные окрашены, и это облегчает их обнаружение. Интенсивность окраски пятен можно усилить, опрыскивая хроматограмму 0,01 н. H_2SO_4. Получение этих производных удобно, потому что приготовить используемый реагент в чистом виде легче и безопаснее, чем работать с 3,5-динитробензоилхлоридом, при перегонке которого существует опасность взрыва. Способ получения этого реагента описан в работе [26].

Диолы, триолы и полиолы обычно малолетучи и более гидрофильны, чем спирты с одной гидроксильной группой в молекуле. Большие пробы вицинальных диолов можно быстро хроматографировать с помощью таких систем, как хлороформ — метанол, эфир — вода, этилацетат — вода (см., например, [12]). Обнаружение их лучше всего проводить окисляющими реагентами, в частности перманганатом калия, 5%-ным раствором нитрата серебра в 25%-ном аммиаке или иодной кислотой [83]. Следует иметь в виду, что целлюлоза также медленно окисляется, так что на ней можно обнаруживать только вещества, которые окисляются с существенно большей скоростью.

Обнаружение иодной кислотой и крахмалом. Хорошо высушенную хроматограмму слегка опрыскивают 0,01 *М* водным раствором иодной кислоты, сушат 8—10 мин на воздухе при комнатной температуре и опрыскивают 35%-ным раствором тетрабората натрия, содержащим 0,8% иодида калия, 0,9% борной кислоты и 3% растворимого крахмала (чтобы он растворился, смесь некоторое время кипятят). В результате такой обработки на синем фоне появляются белые пятна. Контрастность достигает максимума через 10 мин.

3.5.2. САХАРА

Сахара, сахарные спирты, вообще полиолы и их производные очень гидрофильны и обнаруживаются без труда. Описан ряд обнаруживающих реагентов на сахара. Чаще всего для обнаружения используются реакции сахаров со спиртами, приводящие к образованию фурфурола, который легко дает цветные реакции. Другие реакции обнаружения основываются на восстанавливающих свойствах многочисленных сахаров, наличии в них карбонильной или вицинальной диольной группы.

В качестве обнаруживающего реагента первой группы часто применяют опрыскивание 3%-ным раствором гидрохлорида *п*-анизидина во влажном *н*-бутаноле [57] и нагревание до 100—105 °С. Альдогексозы дают коричневые, а альдопентозы розовые пятна. Вместо гидрохлорида можно использовать фосфат, а вместо *н*-бутанола — водный этанол с добавкой фосфорной кислоты. К числу реагентов общего назначения относится анилинбифталат (ОР-17). Альдопентозы дают светло-красные пятна и флуоресцируют, альдогексозы, метилальдопентозы и гексуроновые кислоты дают оливково-коричневые пятна и флуоресцируют желтым цветом. Фталевую кислоту можно заменить на щавелевую, а вместо указанных выше двух оснований можно использовать для обнаружения следующие основания или их соли: *м*-фенилендиамин, фосфат *о*-дианизидина, фосфат дифениламина, ацетат или трихлорацетат бензидина, гидрохлорид *п*-толуидина, оксалат *м*-фенилендиамина, *п*-аминобензойную кислоту и др.

К той же группе относятся реагенты, в состав которых вместо амина входит фенольное соединение, например резорцин, орсин, нафтол, нафторезорцин, антрон и др. Наибольшее распространение получил реагент на основе нафторезорцина (ОР-16). С этими реагентами взаимодействуют главным образом кетозы. α-Нафтиламин представляет собой специфический реактив на кетозы. Раствор (0,5%-ный) α-нафтиламина в этаноле смешивают с сиропообразной фосфорной кислотой в соотношении 5 : 1. После опрыскивания хроматограмму нагревают несколько минут при 105 °С. В реакцию с этим реагентом вступают также олигосахариды, содержащие кетозы.

Наконец, к этой группе относятся реагенты, содержащие аминофенолы или другие компоненты, например *о*-аминофенол, *п*-аминофенол, аминоазобензол, 2-аминобифенил, мочевину и др.

Во вторую группу (окислителей) входят такие реагенты, как нитрат серебра (ОР-2), перманганат калия (ОР-10), хлорид трифенилтетразолия и родственные ему соединения, 3,4-динитробензойная и 3,5-динитросалициловая кислоты и др., т. е. все соединения, меняющие окраску при окислительно-восстановительных реакциях. Методика обнаружения нитратом серебра — наиболее распространенным реагентом (ОР-2) этой группы — описана в разд. 9.9, гл. 9.

Под действием щелочного раствора перманганата калия (ОР-10) образуются желтые пятна на фиолетовом фоне. Со временем фон становится коричневым, а пятна серыми. Если к реагенту добавить 4 части 2%-ного раствора периодата натрия, то фон значительно дольше остается фиолетовым (периодат регенерирует перманганат) и не смывается. С перманганатом реагирует также большое число легко окисляемых соединений.

Бесцветные соединения — хлорид трифенилтетразолия (ТФТ) или тетразолиевый синий (ТС) (ОР-30) — при восстановлении приобретают интенсивную окраску. Для обнаружения хроматограмму опрыскивают смесью (1 : 1) 2%-ного водного раствора ТФТ и раствора гидроксида натрия. Если хроматограмму необходимо обнаруживать погружением, то используют метанольный раствор реагента, в котором сахара только малорастворимы. После опрыскивания или погружения хроматограмму осторожно нагревают примерно 20 мин во влажной атмосфере при 75 °С, после чего сушат 30 мин при 70 °С при затемненном освещении. В результате на розовом фоне появляются красные пятна, темнеющие на свету. 3,4-Динитробензойная кислота при восстановлении также меняет окраску на густо-синюю. Хроматограмму опрыскивают 1%-ным раствором кислоты в 2 н. растворе карбоната натрия, после чего сушат 5—10 мин при 100 °С. Появляющиеся после такой обработки синие пятна при нагревании становятся коричневыми. Восстановители, например аскорбиновая кислота, реагируют быстрее всего, практически сразу, через 1—2 мин реагируют кетозы, через 4 мин альдопентозы и альдогексозы и самыми последними реагируют сахариды. Сахароза реагирует только после предварительного гидролиза соляной кислотой непосредственно на бумаге. Аналогичную реакцию можно провести с 3,5-динитросалициловой кислотой.

В третью группу входят реагенты специфического обнаружения вицинальных диолов. Это иодная кислота (ОР-18), тетраацетат свинца и смесь бромфенолового синего с борной кислотой.

Тетраацетат свинца используют в виде отфильтрованного 1%-ного раствора в бензоле. Сначала опрыскивают хроматограмму ксилолом, который менее летуч, чем бензол, затем реагентом и сушат на воздухе. Образуются белые пятна на коричневом фоне. Реакция малочувствительна.

Бромфеноловый синий (40 мг) и борную кислоту (100 мг) растворяют в 10 мл этанола. Раствор смешивают с 7,5 мл 1%-ного раствора тетрабората натрия и доводят объем смеси до 100 мл этанолом. С этим реагентом реагируют только α-*цис*-диолы и органические кислоты. Реагент не слишком чувствителен и не слишком специфичен.

Полиметильные производные сахаров можно обнаружить, опрыскивая хроматограммы раствором 0,4 г гидрохлорида диметил-*п*-фенилендиамина в 100 мл 2%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и нагревая их затем 1—2 мин при 125 °С. Появляющиеся на хроматограмме пятна окрашены в различные цвета.

Ацетаты сахаров и лактоны можно обнаружить благодаря входящей в них сложноэфирной группе. Сначала хроматограмму опрыскивают раствором, приготовленным смешением одной

части раствора гидрохлорида гидроксиламина (7 г этого вещества в 100 мл метанола) с одной частью раствора гидроксида калия (7,2 г гидроксида калия в 100 мл метанола) с последующей фильтрацией (для отделения осадка хлорида калия); далее хроматограмму сушат 10 мин при комнатной температуре и снова опрыскивают 1—2%-ным раствором хлорида железа(III) в 1%-ной соляной кислоте. На желтом фоне появляются сине-фиолетовые пятна. Фосфаты сахаров можно обнаружить также реагентами, содержащими молибдат аммония.

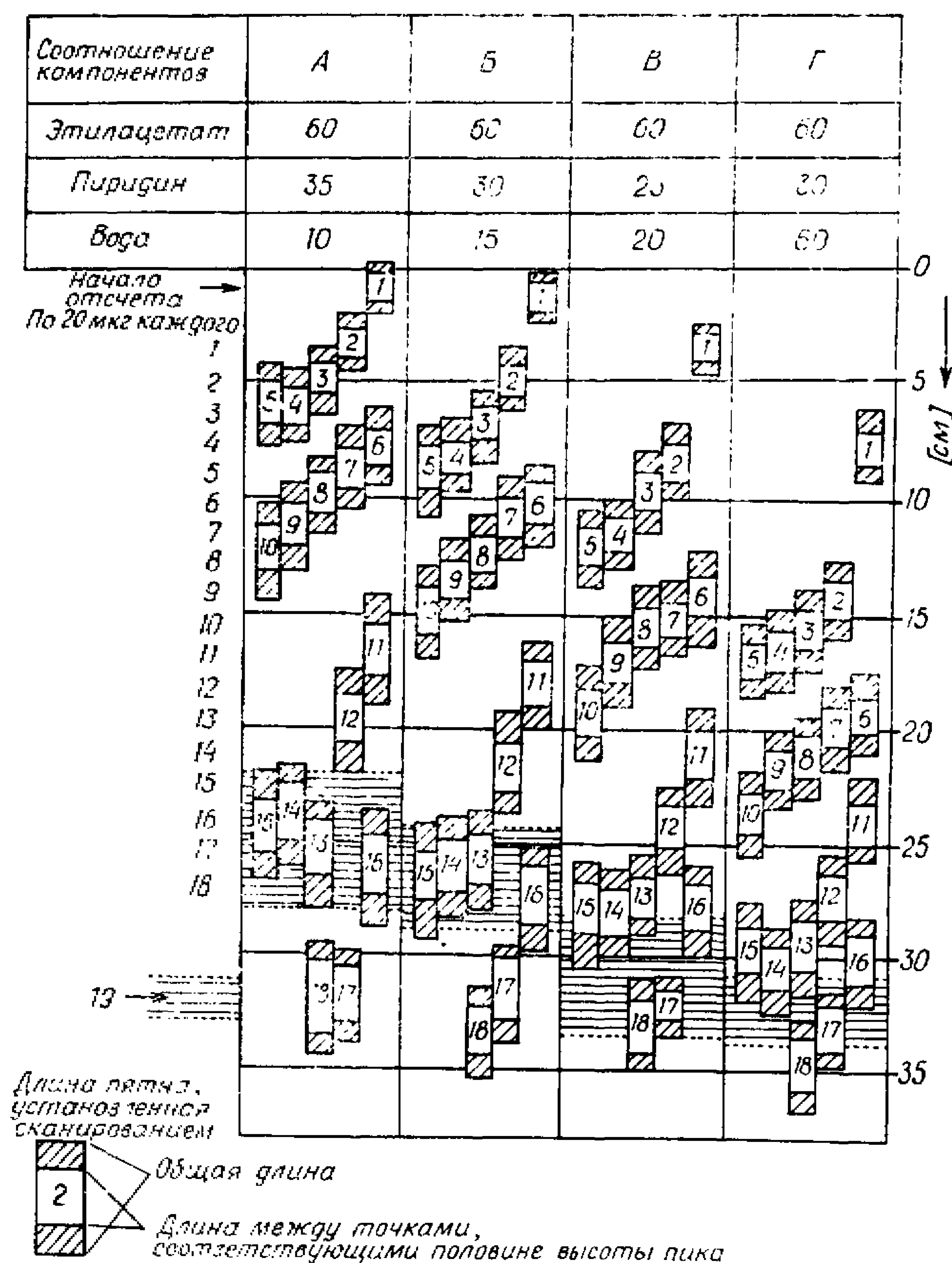


Рис. 3.22. Разделение сахаров методом БХ [87]. Влияние соотношения компонентов в смеси этилацетат—пиридин—вода на величины R_f.

Пробу наносили на ватман № 3 ММ, уплотненный полиэтиленом, и проводили 20-часовое нисходящее элюирование. Незаштрихованная часть пятна показывает его длину между точками, соответствующими половине максимальной плотности. *1* — стахиоза, *2* — рафиноза, *3* — мелибиоза, *4* — лактоза, *5* — изомальтоза, *6* — лактулоза, *7* — целлобиоза, *8* — мальтоза, *9* — палатиноза, *10* — сахароза, *11* — галактоза, *12* — глюкоза, *13* — сорбоза, *14* — манноза, *15* — фруктоза, *16* — арабиноза, *17* — фукоза, *18* — ксилоза, *19* — мочевина.

Таблица 3.7

Величины R_{TMG}[a] некоторых метилированных сахаров, полученные при хроматографировании в системе *н*-бутанол — этанол — вода (5 : 1 : 4) [55]

Соединение	R_{TMG}
Мальтоза	0,02
Глюкоза	0,09
2-Метилглюкоза	0,22
6-Метилглюкоза	0,27
2-Метилгалактоза	0,23
6-Метилгалактоза	0,18
4-Метилманноза	0,32
2-Метилксилоза	0,38
2-Метиларабиноза	0,38
Диметилированные сахара	0,41—0,66
Триметилированные сахара	0,64—0,94
2,3,4,6-Тетраметилглюкоза	1,00
Тетраметилированные сахара	0,88—1,01
Рамноза	0,30
4-Метилрамноза	0,57
3,4-Диметилрамноза	0,84
2,3,4-Триметилрамноза	1,01

[a] R_{TMG} — подвижность относительно подвижности 2,3,4,6-тетраметилглюкозы, принятой за единицу.

Аминосахара можно обнаружить обычными реагентами на сахара, а также нингидрином, смесью диметиламинобензальдегида и ацетилацетона и др. Олигосахариды удается различать с помощью реагента, представляющего смесь (5 : 5 : 1 по объему) 4%-ного этанольного раствора анилина, 4%-ного этанольного раствора дифениламина и фосфорной кислоты (уд. масса 1,7). Этот реагент необходимо готовить непосредственно перед употреблением. Хроматограмму опрыскивают им с обеих сторон, а затем нагревают ее 10 мин при 80 °С. После этого наблюдают хроматограмму под УФ-облучением. Сахариды с 1,4-связями образуют синие пятна, а соединения с 1,6-связями — коричневые. Рейхель и Шивек [106] обнаруживали и идентифицировали сахара по цветным реакциям с реагентами на основе хлорида титана(IV), так как различные сахара образуют с эти-

Таблица 3.8

Величины R_f и R_G[а] некоторых сахарных спиртов

Соединение	*н*-Пропанол — этилацетат — вода (7 : 1 : 2) [69]	Этилацетат — уксусная кислота — вода[б] (9 : 2 : 2)		Этилацетат — пиридин — вода (9 : 2 : 2) [59]
		[21]	[14]	
Глицерин	0,61			
Эритрит		0,49	0,23	
Арабит	0,47		0,14	
L-Арабит		0,43		
Рибит (адонит)	0,42	0,40	0,14	
Ксилит	0,38		0,14	
Аллит			0,17	
Альтрит			0,16	
Глюцит (сорбит)	0,63	0,31[г]	0,08	0,92
Маннит	0,36	0,34[г]	0,08	1,00
Галактит (дульцит)	0,35	0,31	0,07	0,86
Инозит	0,09[в]	0,11		
Волемит		0,28[г]		
Пинит		0,36		

[а] R_G — отношение R_f соединения к R_f глюкозы, принятому за единицу.

[б] В этой хроматографической системе при метилировании сахара величина R_f возрастает на 0,16±0,06, а при отщеплении гидроксильной группы (дезоксисахар) на 0,20±±0,10.

[в] Миоинозит.

[г] D-Изомеры.

ми реагентами различно окрашенные комплексы.

Поскольку сахара гидрофильны, их можно хроматографировать только в полярных растворяющих системах, например в смеси Партриджа [верхняя фаза смеси *н*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5)], смесях *н*-бутанол — пиридин — вода (6 : 4 : 3), коллидин — вода, фенол — вода (4 : 1) или в воде, насыщенной фенолом, и т. п. В настоящее время чаще всего используют смеси этилацетата, пиридина и воды в разных соотношениях. Результаты разделения разных сахаров показаны на рис. 3.22, а результаты разделения некоторых метильных производных сахарных спиртов и кислот приведены в табл. 3.7—3.9.

Опубликована [143] отличная сводка величин R_f олигосахаридов (по данным до 1966 г.). Системы растворителей для раз-

Таблица 3.9

Величины R_f и R_G сахарных кислот

Кислота	$R_f^а$ [89]	$R_G^б$ [37]
Глюкуроновая	0,17[в]	0,27
Галактуроновая	0,15[в]	0,18
Маннуроновая	0,22[в]	0,35
L-Гулоновая	0,16	
Гулуроновая		0,28
5-Кето-D-глюконовая	0,27	0,47
2-Кето-D-глюконовая		0,21
D-Галактоно-γ-лактон	0,30	

[а] *н*-Бутанол — этанол — вода (4 : 1 : 5) на О-карбоксиметилцеллюлозе.
[б] Пиридин — этилацетат — уксусная кислота — вода (5 : 5 : 1 : 3). Величины R_G относятся только к хроматографированию свежеприготовленной растворяющей смесью в камере, насыщенной смесью пиридин — этилацетат — вода (11 : 40 : 6), и только к D-изомерам.
[в] D-Изомеры.

деления олигосахаридов в большинстве случаев составляются на основе *н*-бутанола или этилацетата с добавлением пиридина, уксусной кислоты или этанола. Тунг и др. [130] использовали для разделения олигосахаридов смеси 2-пропанол — вода — уксусная кислота (54 : 8 : 18), нитрометан — вода — этанол (32 : 23 : 41) и нитрометан — уксусная кислота — вода — этанол (35 : 10 : 23 : 41).

Для хроматографирования аминосахаров и фосфатов сахаров применяли системы, подобные используемым для разделения простых сахаров. Для разделения гексозаминов и их производных (метаболитов) Бауэри и др. [8] применяли также следующие системы (бумага ватман № 3) : этанол — 1М ацетат аммония (pH 3,5) (5 : 2); этанол — 1М ацетат аммония (pH 7,5) (5 : 3) и 1-пропанол — 1М ацетат аммония (pH 5) — вода (7 : 1 : 2). Патель и Патель [96] разделили крахмал на амилозу и амилопектин, элюируя полисахариды водой, насыщенной бутанолом.

3.5.3. АЛЬДЕГИДЫ И КЕТОНЫ

Алифатические и алициклические альдегиды и кетоны (вплоть до C_{10}) летучи; в настоящее время их обычно разделяют методом ГХ. Чтобы их можно было анализировать с помощью БХ, члены этих рядов необходимо перевести в нелетучие и по возможности окрашенные производные, а высшие чле-

Таблица 3.10

Величины R_f 2,4-динитрофенилгидразонов алифатических альдегидов и кетонов в системе циклогексан — диметилформамид[а] [47]

Альдегиды	R_f	Кетоны	R_f
Формальдегид	0,20	Ацетон	0,48
Ацетальдегид	0,32	Метилэтилкетон	0,66
Акролеин	0,39	Гексен-1-он-5	0,71
Кротоновый	0,47	Диэтилкетон	0,81
Пропионовый	0,50	Метил-*н*-бутилкетон	0,85[б]
н-Масляный	0,66	Метилизобутилкетон	0,85[б]
н-Валериановый	0,76	Циклопентанон	0,74
н-Гексиловый	0,82	Циклогексанон	0,77
2-Этилгексиловый	0,88	2,4-Динитрофенилгидразин	0,01
Додециловый	0,91		

[а] Бумагу предварительно погружают в 25%-ный раствор диметилформамида в этаноле, сушат на воздухе 10—15 мин и после этого элюируют пробу циклогексаном.

[б] Изомерные альдегиды и кетоны не разделяются.

ны этих рядов можно непосредственно хроматографировать в растворителях, пригодных для разделения высших спиртов и жирных кислот. В настоящее время альдегиды и кетоны чаще всего анализируют в виде 2,4-динитрофенилгидразонов, пятна которых окрашены в цвета от оранжевого до красного и которые поэтому легко обнаружить. Под УФ-облучением они сильно гасят флуоресценцию. Интенсивность окраски в видимом свете можно усилить, опрыскивая хроматограмму 1%-ным этанольным раствором гидроксида натрия (пятна становятся фиолетовыми).

Величины R_f некоторых 2,4-динитрофенилгидразоновых производных в наиболее часто используемой системе приведены в табл. 3.10. Те же производные можно также хроматографировать в обращенно-фазной системе на бумаге, пропитанной 40%-ным керосином (т. кип. 200—220 °С) в петролейном эфире (т. кип. 40—70 °С), применяя в качестве подвижной фазы 80%-ный водный этанол или 65%-ный водный 1-пропанол.

КИСЛОТЫ

Органические кислоты могут значительно отличаться друг от друга по свойствам: они могут быть сильными или слабыми, гидрофильными или липофильными, алифатическими или аро-

матическими, одно-, двух-, трех- или многоосновными и т. д., а поэтому для их разделения пригодны самые различные системы растворителей. Однако при обнаружении кислот в большинстве случаев используется их общее свойство — кислотность. Их обычно определяют с помощью индикаторов. В литературе описаны многочисленные индикаторы на кислоты; к числу наилучших относятся, по-видимому, бромкрезоловый зеленый, бромфеноловый красный и дихлорфенолиндофенол. Последний представляет интерес также потому, что это не только кислотно-основной, но и окислительно-восстановительный индикатор; используя его, можно идентифицировать некоторые сильно восстанавливающие кислоты, например аскорбиновую, галловую и др. Для обнаружения применяют слабо концентрированные растворы индикаторов, например слегка подщелоченный 0,05%-ный раствор бромкрезолового зеленого в этаноле (ОР-1). Кислоты дают желтые пятна на синем фоне. Чтобы получить чисто-синий фон, надо после элюирования кислотными или щелочными системами удалить с хроматограмм следы кислот или оснований, входивших в состав подвижной фазы. Поскольку в состав систем растворителей часто входит уксусная или муравьиная кислота, целесообразно ускорить их удаление с хроматограмм, обрабатывая хроматограмму паром над чашкой с кипящей водой или обдувая ее током горячего воздуха или водяного пара. Высшие жирные кислоты удобно перевести в их нерастворимые медные соли; с этой целью сухую хроматограмму погружают на 30 мин в раствор ацетата меди (10 мл насыщенного раствора разбавляют водой до объема 250 мл). Затем промывают ее в течение часа проточной водой и погружают на 30 мин в 1,2%-ный раствор феррицианида калия, вновь промывают проточной водой и сушат. При этом на хроматограмме появляются розово-фиолетовые пятна.

Танимура и др. [125] перед обнаружением переводили кислоты в гидроксамовые производные. Проводили эту реакцию они следующим образом: последовательно опрыскивали хроматограмму 10%-ным раствором дициклогексилкарбодиимида в метиленхлориде и 10%-ным кислотным раствором $FeCl_4 \cdot 6H_2O$, насыщенным гидрохлоридом гидроксиламина. Уже через минуту после опрыскивания на хроматограмме наблюдались красно-фиолетовые пятна. Не обнаруживается при этом только щавелевая кислота, потому что в ходе реакции она разлагается на CO_2 и CO. Амино- и оксикислоты дают положительную реакцию, сложные эфиры — отрицательную.

В нейтральных системах органические кислоты диссоциируют в процессе хроматографирования, образуя вытянутые пятна с «хвостами». Такие кислоты следует перевести в полностью диссоциированное состояние, добавляя основание к раствори-

телю, или полностью подавить диссоциацию, добавляя в систему растворителей кислоту. Пятна кислот, которые значительно сильнее кислоты, входящей в состав подвижной фазы, получаются вытянутыми из-за неполного подавления диссоциации. В этом случае можно добавить к растворителю сернистую кислоту (это довольно сильная и в то же время летучая кислота), а при разделении наиболее сильных органических кислот, например щавелевой, лимонной и т. п., можно пропитать бумагу 1%-ной серной кислотой. При этом получаются круглые пятна, но их нельзя обнаружить с помощью индикаторов. Однако многие из этих кислот обнаруживаются раствором перманганата калия, который обычно окисляет их и дает пятна от желтого до белого цвета на фиолетовом фоне.

Низшие жирные кислоты летучи, и их следует хроматографировать в виде аммонийных солей [в системе 1-бутанол — 1,5 н. аммиак (1 : 1)] или в форме амидов, фенилгидразидов или эфиров с 2,4-динитробензиловым спиртом. В первом случае величины R_f находятся в пределах от 0,1 (муравьиная кислота) до 0,75 (каприловая кислота); во втором случае соответствующие вещества можно хроматографировать растворяющей системой гексан — бензол (21 : 1) на бумаге, пропитанной формамидом.

Высшие жирные кислоты можно хроматографировать в исходном состоянии, поскольку они нелетучи, используя обращенно-фазные системы. Хроматограмму погружают в раствор ундекана или керосина в бензоле с добавкой уксусной кислоты (соотношение компонентов 14 : 18 : 1); избыток раствора удаляют, промокая хроматограмму с обеих сторон фильтровальной бумагой и затем подсушивая ее 5—10 мин на воздухе. Элюирование проводят 90—95%-ной уксусной кислотой. Результаты хроматографирования можно улучшить, применяя более плотную бумагу и нанося пробы в виде тонкой горизонтальной линии или полосы. Чтобы отделить насыщенные кислоты от ненасыщенных, Клячко-Гурвич и др. [66] добавляли к подвижной фазе нитрат серебра.

Многоосновные карбоновые кислоты благодаря их нелетучести и относительно высокой полярности можно хроматографировать с помощью ряда обычных систем средней полярности. Характер разделения иллюстрируется данными табл. 3.11.

Интересный метод разделения смеси жирных кислот описан Покорным и др. [101]. Эти авторы использовали ватман № 3, пропитанный насыщенным метанольным раствором мочевины, с которой некоторые кислоты образуют аддукты, что облегчает разделение. Подвижной фазой служил насыщенный мочевиной метанол. При 18—25 °С фронт растворителя проходит 14 см примерно за 90 мин. Низшие жирные кислоты характеризуются

Таблица 3.11

Величины R_f некоторых двухосновных карбоновых кислот и оксикислот

Кислота	*н*-Пропанол — конц. аммиак[а] (6 : 4) [60]	*н*-Бутилацетат, насыщенный водой[б] [123]	Тетрахлорметан — уксусная кислота[в] (50 : 1) [123]
Щавелевая	—	0,18[г]	—
Малоновая	0,23	0,25[г]	—
Янтарная	0,30	0,31	0,02
Глутаровая	0,34	0,48	0,03
Адипиновая	0,39	0,63	0,09
Пимелиновая	—	0,77	0,24
Пробковая	0,49	0,87	0,42
Азелаиновая	0,58	0,80	0,66
Себациновая	0,65	0,93	0,80
Гликолевая	0,39	0,13[г]	—
Молочная	0,48	0,24[г]	—
Глицериновая	0,38	—	—
Яблочная	0,19	0,06[г]	—
Винная	0,15	0,01[г]	—
Фумаровая	0,23	0,07[г]	—
Малеиновая	0,21	0,34[г]	—
Глиоксиловая	—	0,02[д]	—

[а] Ватман № 1.
[б] Ватман № 4.
[в] Ватман № 4; бумагу насыщали примерно 16 ч в камере парами компонентов и водой.
[г] Величины R_f получены на бумаге, пропитанной 1%-ной серной кислотой.
[д] Эта величина, полученная при элюировании насыщенным водой бутилацетатом, соответствует гидрату глиоксиловой кислоты.

R_f 0,8—0,9, деканкарбоновые кислоты — 0,5—0,6, лауриновая кислота — 0,1—0,2, а миристиновая и более высокомолекулярные кислоты остаются на стартовой линии. Ненасыщенные жирные кислоты, в молекулах которых первая двойная связь находится у девятого и более удаленных атомов углерода (олеиновая, элаидиновая, линолевая, линоленовая, 11-икозановая, эруковая, ацетэруковая), также остаются на стартовой линии.

Величины R_f *ароматических кислот* зависят главным образом от числа карбоксильных и фенольных гидроксильных групп. В табл. 3.12 приведены величины R_f ряда ароматических кислот, полученные с двумя широко используемыми системами.

Таблица 3.12

Величины R_f некоторых фенольных кислот [5]

Кислота	Изопропанол — аммиак — вода (8 : 1 : 1)	Бензол — пропионовая кислота — вода (2 : 2 : 1)
Салициловая	0,78	0,88
м-Оксибензойная	0,39	0,53
п-Оксибензойная	0,23	0,55
о-Оксифенилуксусная	0,76	0,57
м-Оксифенилуксусная	0,46	0,49
п-Оксифенилуксусная	0,42	0,49
о-Оксикоричная	0,35	0,70
м-Оксикоричная	0,44	0,58
п-Оксикоричная	0,28	0,58
3-Метокси-4-оксибензойная	0,22	0,80
3-Метокси-4-оксифенилуксусная	0,39	0,66
3-Метокси-4-оксикоричная	0,27	0,80
Протокатеховая	0,06	0,16
Гентизиновая	0,68	0,26
α-Резорциловая	0,35	0,09
β-Резорциловая	0,39	0,38
γ-Резорциловая	0,77	0,11
Сиреневая	0,18	0,79

Система, подобная одной из них, применена Франком и Поспишиловой [38] для изучения электрохимического восстановления кислот. Эта система представляет собой смесь 1-пропанол — аммиак (2 : 1), и в ней эти авторы хроматографировали 31 ароматическую кислоту и определили величины R_f и $\Delta R_M(r)$ для COOH⟶CHO (0,75), для двух групп COOH (—1,33), для трех групп COOH (—1,94). Величины ΔR_M (g) см. в табл. 3.13.

Значения R_f и цветные реакции различных ароматических кислот можно найти в подробных и широко известных статьях Рейо [108], который исследовал фенольные соединения биологического происхождения.

3.5.5. ФЕНОЛЫ, ФЛАВОНОИДЫ, КУМАРИНЫ

Все эти соединения ароматического ряда характеризуются общим отличительным признаком: в их молекулах имеются гидроксильные группы, непосредственно связанные с аромати-

Таблица 3.13

Величины $\Delta R_M(g)$ различных функциональных групп, полученные в системе *н*-пропанол — аммиак[a] (2 : 1) [38]

Функциональная группа	ΔR_M (*g*)
$—COOH$	+0,86
$—CHO$	—0,75
$—OH$	+0,60
$—NO_2$	0,00
$—SO_3H$	+0,86
$—NH_2$	+0,50
$—COOCH_3$	—0,10
$—CONH_2$	+0,56
$—CN$	+0,06

[a] R_f бензойной кислоты равна 0,70.

ческим ядром. В молекулах флавоноидов и кумаринов ароматическое кольцо конденсировано с кислородным гетероциклом. К соединениям данной группы относятся также фенольные кислоты, о которых говорилось в предыдущем разделе.

Хроматографические свойства этих соединений, как и соединений других типов, зависят от их гидрофильности, т. е. от числа полярных функциональных групп, главным образом гидроксильных. Для обнаружения соединений этой группы используются специфические реакции с участием фенольных гидроксильных групп. К числу основных обнаруживающих реагентов относятся 0,1%-ный раствор хлорида железа(III), который дает зеленую окраску с *о*-диоксифенолами и чернильно-синюю окраску с вицинальными триоксифенолами, нитрат серебра (ОР-2), растворы диазотированных аминов, например сульфаниловой кислоты (ОР-20) или *п*-нитроанилина (ОР-19). Реже применяется классический реагент Фолина-Дениса или Гиббса; (1%-ный этанольный раствор 2,6-дихлорхинонхлоримида). Удобен также реагент, в состав которого входят хлорид железа(III) и феррицианид калия (ОР-21); в реакцию с этим реагентом вступают не только фенолы, но и все другие восстанавливающие вещества. Флавоноиды и кумарины можно также обнаружить по их флуоресценции. Флавоноиды, если только не происходит гашения флуоресценции, обычно проявляют себя флуоресценцией от желтого до зеленого цвета, которая усиливается после обработки хроматограммы парами аммиака. Кумарины чаще всего об-

наруживают по флуоресценции от белого до синего цвета, которая становится интенсивнее или меняет оттенок после опрыскивания хроматограмм растворами солей некоторых металлов, например 1%-ным этанольным раствором хлорида алюминия, 1%-ным водным раствором основного ацетата свинца, 0,2%-ным водным раствором $FeNH_4(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$, водным раствором сульфата меди (1,73 г сульфата меди плюс 17,3 г цитрата натрия и 10 г безводного карбоната натрия в 100 мл воды). Катехины и ароматические соединения с флороглюциновым расположением кислородных функций дают вишнево-красные пятна при обработке 1%-ным раствором ванилина в концентрированной соляной кислоте. Тириманна и Перера [128] описали специфические обнаруживающие реагенты на катехины (реагент Джаффе: 1%-ный раствор пикриновой кислоты в 95%-ном этаноле и после сушки 5%-ный раствор гидроксида калия в 80%-ном этаноле; через 30 с появляются стойкие красные пятна). Для обнаружения дигидрохальконов Джентили и Горовиц [49] предложили боргидрид натрия и 2,3-дихлор-5,6-дициан-1,4-бензохинон.

Выбор системы растворителей практически зависит от числа гидроксильных групп в молекуле, а если проводится разделе-

Таблица 3.14

Величины R_f некоторых флавоноидов

Флавоноиды	*н*-Бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5) [48]	Этилацетат, насыщенный водой [40]	Уксусная кислота — вода (15 : 85) [40]	Бензол — уксусная кислота — вода (125 : 72 : 2) [144]
Акацетин	>0,93	0,94	0,00	0,75
Апигенин	0,92	0,87	0,15	0,33
Кемферол	0,90	0,90	0,10	0,30
Морин	0,92	0,71	0,27	—
Мирицетин	0,64	0,78	0,12	—
Кверцетагетин	0,45	0,17	0,19	0,00
Кверцетин	0,77	0,81	0,07	0,10
Рамнетин	0,87	0,92	0,08	—
Кверцитрин	0,85	0,50	0,46	—
Рутин	0,66	0,15	0,62	—
Эриодиктиол	0,61	—	—	0,29
Гесперетин	0,90	0,97	0,50	0,60
Нарингенин	0,92	—	—	0,49
Гесперидин	0,58	0,12	0,80	—
Нарингин	0,61	0,51	0,80	—

ние фенольных (флавоноидных) гликозидов, также от числа компонентов сахаров. Для большинства гидрофильных фенольных соединений, например гликозидов и антоцианов, наилучшими оказались водные системы, в частности 10—15%-ная уксусная кислота и 2 н. соляная кислота. Иногда, однако, применяют также 30—40%-ную уксусную кислоту. Широко используют также двухфазные гидрофильные системы: смесь Партриджа, смесь *м*-крезол — уксусная кислота — вода (50:2:48) и насыщенный водой бутанол. Несколько менее гидрофильные соединения хроматографируют с помощью таких систем: бензол — уксусная кислота — вода (например, 6:7:3), этилацетат — вода, 1-бутанол — ксилол — уксусная кислота — вода (например, 2:8:2:8 и т. п.) и другие. Хроматографическую бумагу часто обрабатывают буферным раствором или пропитывают. Величины R_f некоторых флавоноидов, полученные в четырех элюирующих системах, приведены в качестве иллюстрации в табл. 3.14.

3.5.6. СТЕРОИДЫ И ТЕРПЕНОИДЫ

Эта группа веществ настолько велика и имеет такое важное значение, что в рамках данной книги их нельзя рассмотреть достаточно подробно. Хроматографии этих соединений посвящены специальные монографии [18, 90]. Кроме того, в настоящее время для анализа стероидов и терпеноидов БХ используют лишь изредка; основным методом анализа стала ТСХ, и все большее распространение получает высокоэффективная жидкостная хроматография. Соединения данной группы нелегко обнаружить, и в ряде случаев с этой целью необходимо применять сильнодействующие реагенты, несовместимые с бумагой.

Наиболее часто используют реагент Карра-Прайса (ОР-5), т. е. насыщенный раствор хлорида сурьмы(III) или сурьмы(V) в хлороформе. Этот реагент дает хорошие результаты, особенно при обнаружении Δ^5-стероидов, образующих окрашенные пятна, в основном красно-оранжевые. Распространен следующий метод обнаружения: хроматограмму выдерживают в атмосфере паров иода или опрыскивают раствором иода в петролейном эфире или водным раствором иодида калия. В последнем случае некоторые стероиды, например холевая кислота, кортизон и др., образуют синие пятна. Соединения с карбонильными группами, особенно сопряженными с двойной связью, можно обнаружить с помощью динитрофенилгидразина (ОР-27). Δ^4-3-Кетостероиды можно обнаружить по их флуоресценции после опрыскивания раствором гидроксида натрия и нагревания или, еще лучше, по

сильному поглощению ими УФ-излучения (длина волны 254 нм). Для обнаружения 17-кетостероидов, а также ряда других кетостероидов можно рекомендовать реагент Циммермана (ОР-29). Восстанавливающие стероиды (кортикоиды) обнаруживают свежим раствором (хранить в темноте!) тетразолиевого синего (ОР-30), под воздействием которого восстанавливающие соединения дают пятна с окраской от синей до фиолетовой, причем чувствительность обнаружения очень велика. Очень часто для обнаружения сапонинов используют *п*-фенилендиаминфталат, а для обнаружения других стероидов — раствор ванилина (ОР-9) или анисового альдегида (ОР-31) в концентрированной серной кислоте. Применим также реагент Кедде: раствор 1 г 3,5-динитробензойной кислоты в смеси 50 мл метанола и 50 мл 2 н. раствора гидроксида калия. При обработке этим реагентом сердечные гликозиды дают фиолетовые пятна, но в реакцию с ним вступают также и другие соединения.

Низшие терпеноиды (сесквитерпены) в настоящее время больше не хроматографируют на бумаге. Тритерпеноиды обычно ведут себя подобно стероидам.

Выбор системы растворителей для разделения стероидов зависит от полярности соединения, т. е. от числа кислородсодержащих функциональных групп, присоединенных к скелету стероида или терпеноида. Чаще всего применяются системы типа предложенных Бушем и Заффарони. В системах Буша неполярные и летучие растворители, например гексан, гептан, петролейный эфир, толуол, тетрахлорметан, сочетаются с водно-спиртовыми неподвижными фазами. Компоненты систем смешивают, встряхивают, дают смеси расслоиться на фазы, после чего используют нижнюю фазу для насыщения атмосферы камеры и приведения бумаги в равновесие с нею, а верхней фазой проводят элюирование. Буш пользовался следующими системами (перечисляются в порядке возрастания полярности): *1*) петролейный эфир — метанол — вода (10 : 8 : 2); *2*) толуол — петролейный эфир — метанол — вода (5 : 5 : 7 : 3); *3*) толуол — петролейный эфир — метанол — вода (667 : 333 : 600 : 400); *4*) петролейный эфир — бензол — метанол — вода (667 : 333 : 800 : 200); *5*) толуол — метанол — вода (10 : 5 : 5); *6*) бензол — метанол — вода (10 : 5 : 5); *7*) толуол — этилацетат — метанол — вода (9 : 1 : 5 : : 5). Если элюирование ведется перечисленными растворителями, важно привести бумагу в равновесие с неподвижной фазой, т. е. со смесью метанола и воды. Для этого хроматограмму перед элюированием выдерживают над парами неподвижной фазы до следующего дня. Далее, очень важно, чтобы атмосфера камеры была насыщена всеми компонентами системы. Очень полезно также небольшое повышение температуры (до 37 °С). В разд. 3.1.2 и в статье [19] описывается способ ускорения до-

стижения равновесия. В качестве иллюстрации приводятся величины R_f некоторых стероидов, полученные для системы *1*: 17-оксикортикостерон 0,00; 11-дезоксикортикостерон 0,39; 21-ацетат 11-дезоксикортикостерона 0,70; тестостерон 0,40; 4-андростен-3,17-дион 0,70, прогестерон 0,85.

При использовании систем Заффарони хроматографическую бумагу пропитывают формамидом (лучше всего 30%-ным раствором в этилацетате) или пропиленгликолем и в соответствии с полярностью стероида или тритерпеноида подбирают подвижный растворитель из ряда, в который входят в перечисленном порядке гексан, толуол, бензол, хлороформ и этилацетат. В табл. 3.15 дан список систем Заффарони, пригодных для разделения различных групп стероидов, а именно кортикоидов, половых гормонов, сердечных гликозидов, сапогенинов, экдизонов и т. д.

Весьма липофильные стероиды поддаются эффективному разделению в обращенно-фазных системах, например парафиновое масло или керосин в качестве неподвижной фазы, смеси спиртов с водой, ацетон или уксусная кислота в качестве подвижной фазы.

При хроматографировании желчных кислот необходимо подавлять их диссоциацию, добавляя уксусную кислоту к растворяющей системе или заменяя ею метанол в растворяющих системах, рекомендованных Бушем. Синдж и др. [117] описали разделение простагландинов на бумаге из стекловолокна. Шнайдер [110] разделял стероидные гликозиды и глюкурониды с помощью главным образом системы этилацетат — толуол — метанол — вода в различных соотношениях, Новер и др. [92] анализировал эти соединения в системах на основе этилацетата или ацетона.

Каротиноиды в настоящее время практически не анализируют методом БХ.

3.5.7. ДРУГИЕ КИСЛОРОДСОДЕРЖАЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ

Хиноны, антрахиноны, конденсированные полициклические соединения, азулены, пигменты из лишайников, лигнины и продукты их разложения и т. п. хроматографируют в обычных системах, в которых анализируют полифенолы или липофильные стероиды. Выбор растворителя также определяется полярностью соединения, числом гидроксильных групп, но прежде всего числом углеродных атомов и отношением этих двух величин. Разделение нейтральных липидов на бумаге из стекловолокна, пропитанной силикагелем, описано Пококом и др. [100].

Таблица 3.15

Системы растворителей, предложенные Заффарони для разделения различных групп стероидов[a] [50, 51] (с разрешения авторов)

Системы	Стероиды						Моноацетаты стероидов			Диацетаты стероидов	
	$C_{19}O_2$	$C_{21}O_2$	$C_{21}O_3$	$C_{21}O_4$	$C_{21}O_5$	$C_{21}O_6$	$C_{21}O_3$	$C_{21}O_4$	$C_{21}O_5$	$C_{21}O_4$	$C_{21}O_5$
Формамид/гексан	+	+	+				+			+	
Пропиленгликоль/гексан	+	+	+				+			+	
Формамнд/гексан — бензол (1 : 1)	+	+	+	+				+	+		+
Пропиленгликоль/гексан — бензол	+	+	+					+	+		+
Формамид/бензол			+	+	+				+		+
Пропиленгликоль/бензол			+	+	+				+		+
Пропиленгликоль/толуол			+	+	+				+		+
Формамид/хлороформ				+	+	+					

[a] Знак плюс — применяемая система.

3.6. БУМАЖНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ

3.6.1. БУМАЖНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ АМИНОКИСЛОТ И ПЕПТИДОВ

В. ТОМАШЕК

В пятидесятых годах, в период бурного развития БХ, был опубликован ряд статей с описанием методик и систем растворителей, предназначенных для разделения белковых гидролизатов или аминокислот, полученных из различных физиологических жидкостей (см. [51, 77]). Эти системы использовались для разделения сложных смесей аминокислот и пептидов и смесей аминокислот, с трудом поддающихся идентификации, например лейцин, изолейцин. С появлением автоматических аминокислотных анализаторов [120], а также новых ионообменников (см. гл. 5) БХ все реже и реже используют для анализа аминокислот и пептидов. В настоящее время в лабораториях, ведущих исследование белков, методом БХ проводят главным образом окончательную очистку простых смесей пептидов, полученных с помощью других методов разделения, кроме того, БХ служит одним из критериев однородности вещества (часто в сочетании с электрофорезом на бумаге), и только в считанных случаях ее применяют для идентификации отдельных аминокислот.

Если не требуется хроматографировать пептиды, то надо с помощью гидролиза отделить аминокислоты от пептидов или белков. Чаще всего для этого применяют кислотный гидролиз, в результате которого триптофан разлагается полностью, а цистин, треонин, серин и иногда тирозин частично. Лучше всего проводить гидролиз 6 н. соляной кислотой.

Для этого разбавляют концентрированную соляную кислоту (~12 н.) равным количеством воды и перегоняют в атмосфере азота. Азеотропную фракцию (5,7 н. соляная кислота с т. кип. примерно 108 °С) собирают и используют для гидролиза. К сухой пробе, помещенной в пробирку (рис. 3.23), добавляют 50—100-кратный избыток этой фракции. Верхнюю часть пробирки вытягивают в пламени до образования капилляра, дают пробирке охладиться и после этого присоединяют к пробирке трубку, ведущую к вакуумной системе. Чтобы заморозить пробу, погружают пробирку в смесь спирта или ацетона с твердой углекислотой. Далее вакуумируют пробирку с пробой вакуумным масляным насосом и запаивают пробирку в том месте, где ранее образовался капилляр. После этого проводят гидролиз при температуре 110 °С в течение 20—24 ч. Для полного гидролиза не-

которых пептидных связей, в частности связей валин — валин, изолейцин — валин и изолейцин — изолейцин, требуется до 96 ч. Благодаря применению перегнанной соляной кислоты, освобожденной от примесей ионов тяжелых металлов, а также благодаря вакуумированию пробы сводится к минимуму деструкция

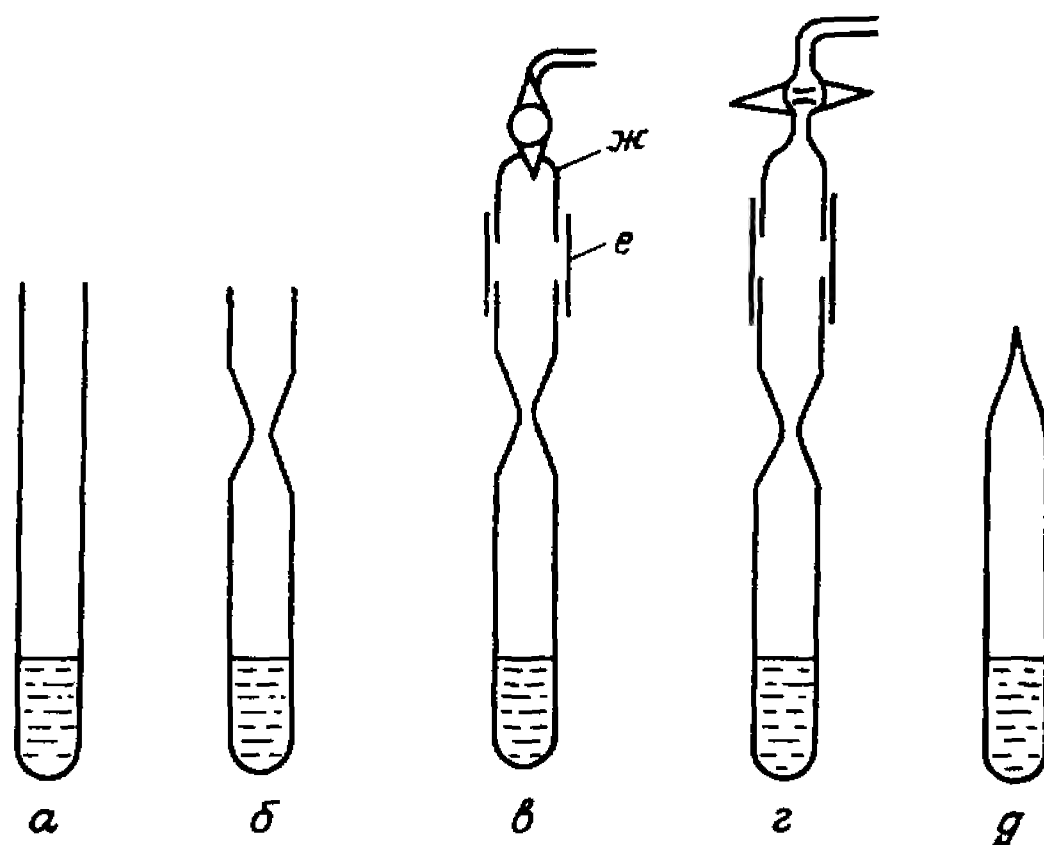


Рис. 3.23. Последовательность операций при запаивании пробирки для гидролиза.

а — пробирка с пробой и 6 н. HCl; *б* — пробирка после образования горловины; *в* — пробирка, соединенная резиновой трубкой *е* с отводом вакуум-насоса (*ж*); *г* — пробирка после откачивания, кран отвода закрыт; *д* — пробирка, запаянная в месте сужения.

некоторых аминокислот (серин, треонин, цистин). Гидролизат упаривают в вакуум-эксикаторе над твердым гидроксидом натрия.

Разделяют посредством БХ аминокислоты и пептиды преимущественно в виде водных растворов; иногда целесообразно заменить воду на *н*-пропанол. Чтобы разделение было полным, в некоторых случаях, как установлено, следует помимо однократного элюирования провести еще и многократное элюирование (рис. 3.24). Полезно хроматографировать исследуемые пробы параллельно со смесью аминокислот известного состава. В лабораторных работах автора применялась стандартная смесь А, содержащая цистеиновую кислоту, лизин, аргинин, серин, глутаминовую кислоту, аланин, тирозин, метионин, фенилаланин, лейцин, а также стандартная смесь Б, в состав которой входили: цистеиновая кислота, гистидин, аспарагиновая кислота, глицин, треонин, аланин, пролин, валин, изолейцин. В 10 мкл смеси находилось около 0,025 мкмоль каждой из перечисленных аминокислот. Хроматографирование неизвестной пробы вместе с такой стандартной смесью позволяет приближенно оценить содержание аминокислот или пептида в пробе.

Подобных систем растворителей описано бесконечно много, однако для рутинного анализа в настоящее время применяется лишь несколько (табл. 3.16 и рис. 3.25), в частности исходная система C_1 и ее модификация C_2, используемые для выделения

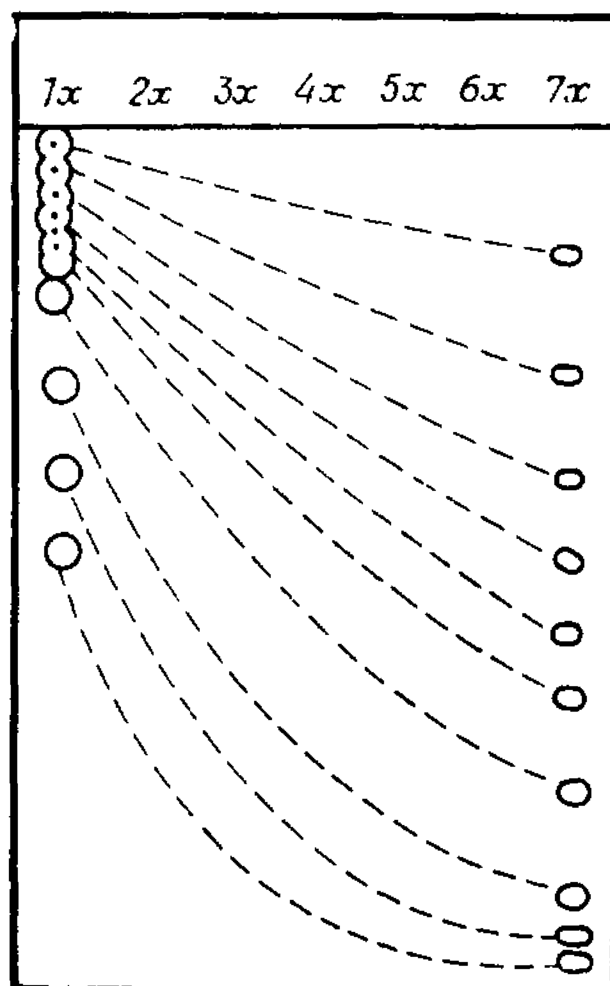


Рис. 3.24. Принцип разделения аминокислот в системе C_2 (табл. 3.16) по Кейлу [65].

После первого элюирования в системе хроматограмму сушат и несколько раз повторно элюируют той же системой. После каждого элюирования хроматограмму сушат. Параллельно с анализируемой пробой хроматографируют стандартную смесь аминокислот. По окончании разделения хроматограмму опрыскивают спиртовым раствором нейтрального красного, чтобы обнаружить зону лейцина — наиболее быстро перемещающейся аминокислоты. Такой вариант метода обеспечивает хорошее разделение всех природных аминокислот, но требует много времени.

аминокислот из пептидов. Для окончательной очистки аминокислот применяется главным образом система C_3. В отдельных случаях читателю рекомендуется обратиться к соответствующей литературе, например [50, 51, 77].

Таблица 3.16

Некоторые системы растворителей для разделения аминокислот и пептидов

Обозначение	Состав	Литература
C_1	*н*-Бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5)	95
C_2[а]	*н*-Бутанол — уксусная кислота — вода (144 : 13 : : 43)	86
C_3[б]	*н*-Бутанол — пиридин — уксусная кислота — вода (60 : 40 : 12 : 48)	138
C_4	Насыщенный водой фенол — пары аммиака [аммиак — вода (1 : 100)]	29

[а] Более экономный метод приготовления системы C_1.

[б] Система особенно пригодна для разделения смесей пептидов и для комбинирования хроматографии с электрофорезом.

Двумерное разделение чаще всего проводят методами БХ и электрофореза на бумаге, а не методом БХ с двумя различными системами растворителей (см. гл. 12).

Особой разновидностью двумерной хроматографии является «диагональная хроматография» [88]. Согласно этой методике,

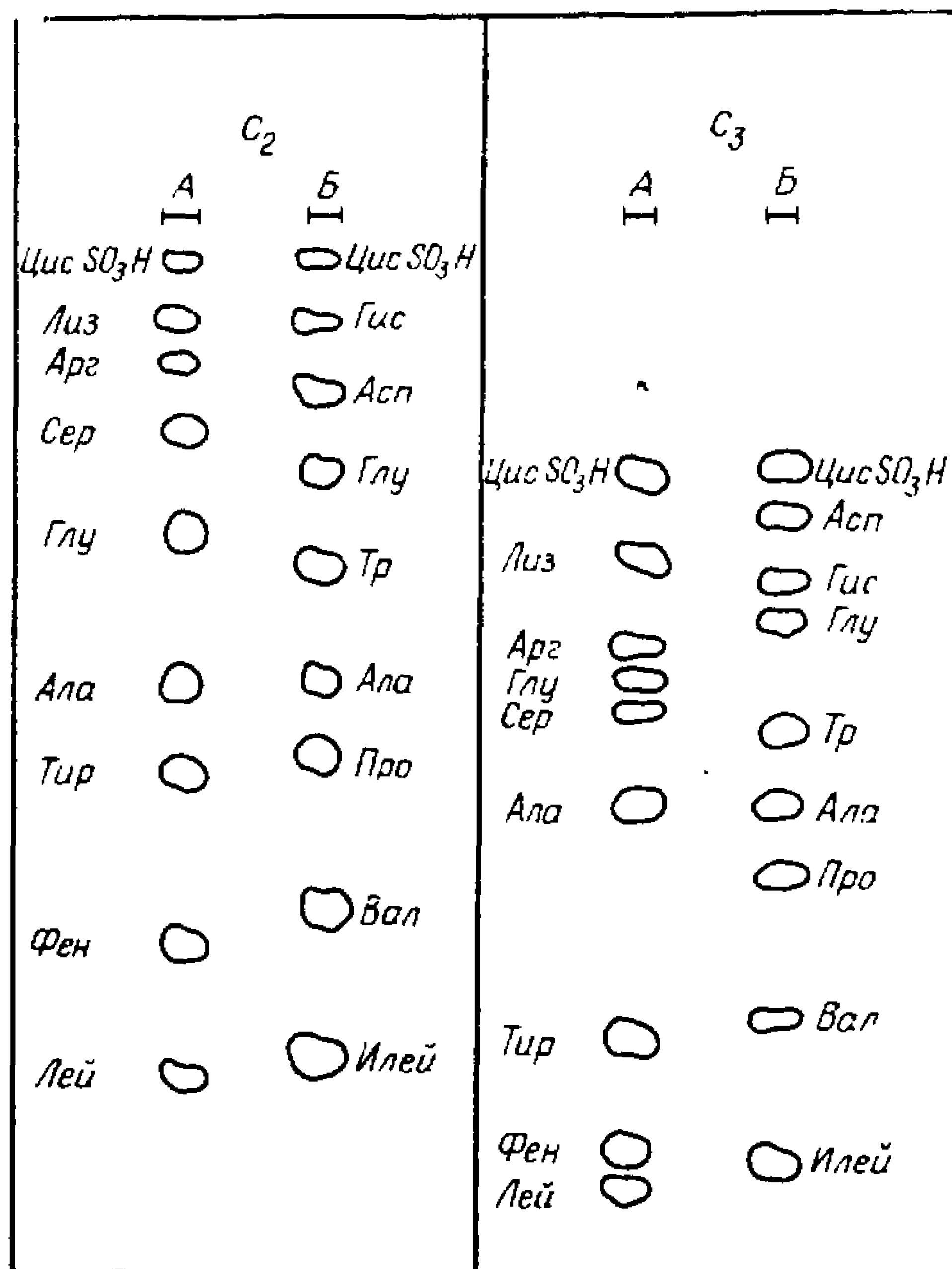


Рис. 3.25. Разделение стандартных смесей (А и Б) аминокислот с помощью систем растворителей C_2 и C_3.

В системе C_2 разделение достигается после пяти- или шестикратного элюирования, в системе C_3 — после однократного.

Цис — цистеиновая кислота, Лиз — лизин, Арг — аргинин, Сер — серин, Глу — глутаминовая кислота, Ала — аланин, Тир — тирозин, Фен — фенилаланин, Лей — лейцин, Гис — гистидин, Асп — аспарагиновая кислота, Гли — глицин, Тр — треонин, Про — пролин, Вал — валин, Илей — изолейцин.

после первого элюирования проводят второе элюирование в перпендикулярном направлении с той же системой растворителей. Все разделенные аминокислоты или пептиды остаются на диагонали хроматограммы. Однако если после первого элюирования провести на бумаге такую реакцию, в которую вступает лишь одна аминокислота (например, реакцию окисления метионина), то образующийся продукт, который характеризуется уже другой величиной R_f, выпадет из диагонали при элюировании во втором направлении. Хартли [53] тщательно разработал этот метод и применил его при электрофоретическом разделении.

ОБНАРУЖЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ И ПЕПТИДОВ

Чаще всего для обнаружения аминокислот и пептидов применяется нингидрин (гидрат трикетогидриндена), так как он образует окрашенные продукты. Самый простой метод обнаружения заключается в следующем. Сухую хроматограмму погружают в раствор нингидрина в ацетоне, чаще всего 0,2%-ный (при этом достигается однородное покрытие бумаги реагентом), сушат в течение непродолжительного времени и помещают в большой ящик, стенки которого опрыскивают спиртовым раствором лимонной кислоты, чтобы исключить попадание на них аммиака. При комнатной температуре пятна аминокислот обнаруживаются примерно через час, и их окраска достигает оптимальной интенсивности примерно за 8 ч. Пятна пептидов обнаруживаются медленнее, поэтому лучше всего выдержать хроматограмму в этом ящике до следующего дня. Появление цветных пятен ускоряется, если хроматограмму нагревают при 50—60 °С.

При двумерном разделении пептидов для обнаружения пятен пригоден значительно более разбавленный раствор нингидрина (0,025%). После элюирования обнаруженных пятен в элюате остается непрореагировавшая с нингидрином (из-за его недостаточной концентрации) пептидная фракция. Эту часть продукта можно использовать для дальнейшего анализа, например определения состава смеси аминокислот после полного гидролиза или определения аминокислот с концевым азотом в молекуле.

Если хроматографирование ведется системами с экстремальными значениями pH, то надо подобрать такой состав нингидринового реагента, который был бы оптимальным в отношении образования окрашенных пятен. Для нейтрализации к реагенту добавляют пиридин, коллидин или уксусную кислоту. Нингидрин дает нестойкое окрашивание: со временем пятна бледнеют или вообще выцветают. Чтобы повысить стойкость окрашивания, хроматограмму пропитывают 1%-ным раствором нитрата меди(II) в ацетоне [142]. Образовавшиеся на хроматограммах красные комплексы устойчивы в течение нескольких лет.

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ СПОСОБЫ ОБНАРУЖЕНИЯ

Обнаружение аргинина и содержащих аргинин пептидов реагентом Сакагучи. Хроматограмму погружают в 0,1%-ный раствор 8-оксихинолина в ацетоне. Далее еще влажную бумагу опрыскивают щелочным раствором гипобромита (0,2 мл брома взбалтывают со 100 мл 0,5 н. раствора гидроксида натрия). Оранжево-красные пятна аргинина и аргининовых пептидов появляются сразу, но так же быстро исчезают.

Обнаружение гистидина и тирозина реагентом Паули. Хроматограмму опрыскивают свежеприготовленным раствором 0,1 г диазотированной сульфаниловой кислоты в 20 мл 10%-ного раствора карбоната натрия. Гистидин и соответствующие пептиды дают отчетливо красные пятна на желтом фоне, пятна тирозина и его пептидов имеют красно-коричневый оттенок.

Обнаружение триптофана и его пептидов. 1 г *п*-диметиламинобензальдегида растворяют в 85 мл ацетона и к раствору добавляют 15 мл концентрированной соляной кислоты. Реагент необходимо каждый раз готовить заново. Хроматограмму погружают в этот реагент; через 2—3 мин появляются фиолетовые пятна триптофана и содержащих его пептидов. Триптофан можно также выявить с помощью других реагентов для обнаружения индолов.

Все описанные специфические реакции можно проводить после обнаружения нингидрином. Однако до проведения специфического обнаружения следует снять фиолетовую окраску, вызванную нингидрином. С этой целью хроматограмму погружают в раствор концентрированной соляной кислоты в ацетоне (1 : 10), после чего сушат. Перед обнаружением триптофана такое обесцвечивание не обязательно, поскольку реагент на триптофан растворен в смеси кислоты с ацетоном и обесцвечивает нингидриновые пятна. Чувствительность обнаружения реагентом Паули и диметиламинобензальдегидом на хроматограммах, обработанных и не обработанных нингидрином, одинакова, а чувствительность обнаружения реагентом Сакагучи после обесцвечивания нингидриновых пятен снижается.

Обнаружение пептидов посредством хлорирования по Рейнделю и Хоппе [107]. Хроматограмму или отрезанную от нее полоску погружают в смесь этанола с ацетоном (1 : 1) и дают ей затем слегка подсохнуть или слегка промокают ее листками фильтровальной бумаги. Влажную хроматограмму кладут на низкую стеклянную решетку, помещенную в неглубокую стеклянную чашку, на дно которой налита смесь 10 мл 0,1 н. раствора перманганата калия и 10 мл 10%-ной соляной кислоты. В чашки большего объема помещают соответственно бо́льшие количества обоих реагентов. Чашку накрывают стеклянной крышкой. Чтобы хлор выделялся более интенсивно, чашку слегка покачивают. Хроматограмму выдерживают в атмосфере выделившихся паров хлора в течение примерно 5 мин, после чего вынимают и держат под вытяжным колпаком или в хроматографическом сушильном шкафу до тех пор, пока она перестанет пахнуть хлором. После этого ее погружают в смесь (1 : 1) 0,05 *М* раствора иодида калия и насыщенного раствора *о*-толуидина в воде. Интенсивность окраски достигает максимума через 1—2 мин. Обработанную таким образом хроматограмму несколько

раз промывают 2%-ной уксусной кислотой. Появление сине-черных пятен, которые не обесцвечиваются уксусной кислотой, свидетельствует о пептидной связи.

3.6.2. КОМПОНЕНТЫ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

К. ШЕБЕСТА

Для разделения компонентов нуклеиновых кислот, как и для анализа ряда других групп соединений, БХ применяется все реже и реже. Ее вытесняют колоночная хроматография на различных производных целлюлозы и декстрана и в еще большей степени ТСХ. Соответственно уменьшилось и число обычно применяемых систем растворителей. Эти системы перечислены в табл. 3.17.

Таблица 3.17

Системы растворителей для разделения компонентов нуклеиновых кислот

Обозначение	Состав	Литература
C_1	Изопропанол — аммиак — вода (7 : 1 : 2)	118
C_2	*н*-Пропанол — аммиак — вода (55 : 10 : 35)	79
C_3	*н*-Бутанол — уксусная кислота — вода (5 : 2 : 3)	99
C_4	Изопропанол — соляная кислота — вода (170 : 41 : : 39)	145
C_5	Изомасляная кислота — 0,5 н. аммиак (5 : 3) (pH 3,6—3,7)	15
C_6	Этанол — 1 *М* ацетат аммония (7 : 3) (pH 7,5)	119
C_7	Насыщенный раствор сульфата аммония — вода — пропанол (79 : 19 : 2)	9

Из числа щелочных систем все еще применяются смеси C_1 и C_2. Первая особенно пригодна для разделения монофосфатов нуклеозидов, а вторая позволяет разделить соединения даже с большим числом фосфатных групп (от динуклеотидов до олигонуклеотидов, высшие фосфорилированные мононуклеотиды), малоподвижные в системе C_1.

Из числа кислотных систем растворителей применяются главным образом смеси C_3—C_5. Системы C_3 и C_4 особенно эффективны при разделении оснований и нуклеозидов; система C_4 пригодна для разделения гидролизатов с последующей спектрофотометрической идентификацией их компонентов. Система C_5 очень неудобна в работе из-за ее резкого неприятного запаха, однако она обладает исключительно высокой разделяющей способностью в отношении свободных нуклеотидов.

Наконец, нельзя не отметить нейтральные системы C_6 и C_7. Первая применяется в синтетической органической химии в тех случаях, когда имеется опасность отщепления ацетильных групп, если применять растворяющую среду с крайними значениями pH. С помощью системы C_7, как установлено, можно разделить фосфаты 2'- и 3'-нуклеозидов. В настоящее время эти соединения обнаруживаются исключительно по гашению флуоресценции, вызванной УФ-облучением лампами со специальными фильтрами (mineralite, chromatolite). Эти соединения обнаруживаются как темные пятна на слегка флуоресцирующем фоне.

3.6.3. АЛКАЛОИДЫ

В группу алкалоидов входят соединения настолько различные по структуре, определяемой основным скелетом молекулы, и полярности, зависящей от характера заместителей, что указать какие-либо общие принципы их хроматографирования не представляется возможным. Поэтому мы ограничимся лишь тем, что приведем примеры разделения определенных групп алкалоидов в нескольких растворяющих системах и перечислим основные обнаруживающие реагенты.

Наиболее важным и распространенным является *реагент Драгендорфа* (ОР-12). При опрыскивании этим реагентом или при погружении в него хроматограммы алкалоиды обнаруживаются в виде ярко-оранжевых пятен на желтом фоне. В эту типичную реакцию вступают только третичные и четвертичные основания. Другие основания можно перевести в четвертичные обработкой диметилсульфатом. Большинство оснований реагирует также с парами иода; в частности, четвертичные основания образуют устойчивые темные пятна. В числе других реагентов следует указать иодоплатинат калия, сульфат церия, фосфомолибденовую кислоту, ванадат аммония, хлорид ртути, иодид калия. Вторичные амины можно обнаружить посредством специфической обращенной реакции Римини (ОР-14). Хроматограмму опрыскивают раствором 1 г нитропруссида натрия в смеси 4 мл ацетальдегида и 21 мл воды, дают ей почти полностью высохнуть и далее опрыскивают 10%-ным раствором карбоната натрия. На желтом фоне появляются пятна ультрамаринового цвета. Эти пятна неустойчивы. Для того чтобы отличить вторичные амины от третичных и четвертичных, можно использовать хлорирование хроматограмм и последующую реакцию с иодидом калия или бензидином [39].

Для хроматографирования алкалоидов в виде их солей, т. е. гидрофильных ионов, чаще всего используют смесь Партриджа [1-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5)], смесь этилацетата с 25%-ной муравьиной кислотой или другие подобные

Таблица 3.18

Величины R_f алкалоидов опиума[а] [137]

Алкалоид	Система растворителей[б]						
	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5	C_6	C_7
Эупаверин	0,85	0,95	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Тебаин	0,31	0,35	0,83	0,95	1,0	1,0	1,0
Наркотин	0,24	0,38	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Этилморфин	0,17	0,28	0,85	0,96	1,0	1,0	1,0
Эукодал	0,17	0,23	0,91	1,0	1,0	1,0	1,0
Дигидрокодеин	0,09	0,20	0,65	0,90	1,0	1,0	1,0
Кодеин	0,06	0,13	0,6	0,84	1,0	1,0	1,0
Папаверин	0,07	0,09	0,89	0,95	1,0	1,0	1,0
Дигидрокодеинон	0,05	0,09	0,54	0,90	1,0	1,0	1,0
Дигидроморфинон	0,00	0,03	0,10	0,28	0,72	0,87	0,86
Котарнин	0,0	0,03	0,14	0,40	0,65	0,90	1,0
Морфин	0,0	0,01	0,05	0,15	0,37	0,54	0,62
Нарцеин	0,0	0,0	0,0	0,02	0,03	0,18	0,42

[а] Хроматографирование проводили на бумаге 2043b Mgl, пропитанной смесью формамид — ацетон (2 : 8), избыток смеси удаляли после пропитки. Равновесие в камере не устанавливали.

[б] Система растворителей: C_1 — керосин — диэтиламин (9 : 1); C_2 — циклогексан — диэтиламин (9 : 1); C_3 — циклогексан — хлороформ — диэтиламин (7 : 2 : 1); C_4 — циклогексан — хлороформ — диэтиламин (5 : 4 : 1); C_5 — циклогексан — хлороформ — диэтиламин (3 : 6 : 1); C_6 — циклогексан — хлороформ — диэтиламин (1 : 8 : 1); C_7 — хлороформ — диэтиламин (9 : 1).

сочетания растворителей. Алкалоиды в форме свободных оснований, т. е. недиссоциированные, обычно значительно более липофильны, и поэтому для их разделения обычно применяют хроматографические системы, содержащие формамид, т. е. пропитывают бумагу формамидом, образующим неподвижную фазу, а в качестве подвижных фаз в зависимости от полярности основания выбирают гексан, ксилол, толуол, бензол и хлороформ, добавляя к ним диэтиламин или какое-либо другое основание для подавления диссоциации алкалоидов. Вальди [137] использовал для систематического анализа алкалоидов семь систем, перечисленных в табл. 3.18 (бумагу он предварительно пропитывал смесью формамид — ацетон (2 : 8) и удалял избыток пропитывающего агента, промокая ее листами фильтровальной бумаги). Анализируя смеси различных алкалоидов или разделяя их по группам, Вальди сначала проводил хроматографирование в двух экстремальных системах C_2 и C_7. В соответствии

с поведением алкалоидов он делил их на следующие группы. *Первая группа*: алкалоиды, имеющие приемлемые значения R_f в системе C_7 (табл. 3.18), в которой более гидрофильные алкалоиды перемещаются вместе с фронтом растворителя. *Вторая группа*: алкалоиды, остающиеся на стартовой линии при хроматографировании в системе C_2, но движущиеся вместе с фронтом растворителя при хроматографировании в системе C_7. В эту группу входит большинство алкалоидов спорыньи. *Третья группа*: алкалоиды, которые при хроматографировании в системе C_2 дают R_f до 0,9. Эта группа наиболее многочисленная. *Четвертая группа*: алкалоиды со значениями R_f в системе C_2, превышающими 0,9, и такие весьма гидрофобные алкалоиды, как эупаверин, резерпинин и аспидоспермин (ранее их относили к третьей группе). Для разделения алкалоидов четвертой группы используют систему C_1 или обращенно-фазные системы (неподвижная фаза — керосин, подвижная фаза — смеси пропанол — диэтиламин — вода в разных соотношениях). В качестве примера в табл. 3.18 перечислены R_f алкалоидов, входящих в состав опиума; с этими соединениями приходится сталкиваться чаще всего.

Очень часто разделение проводят на бумаге, пропитанной буферными растворами. Так, Тевари [126] использовал бумагу ватман № 1, пропитанную или 2%-ным раствором сульфата аммония с pH 5,7 (C_1) или 2%-ным раствором хлорида аммония с pH 6,6 (C_2), а в качестве подвижной фазы — смесь изобутанол — уксусная кислота — вода (10 : 1 : 2). В его статье приведены величины R_f 29 алкалоидов различных типов, полученные в этих системах, а также указаны цветные реакции (табл. 3.19).

3.6.4. ИНДОЛЫ

В этом разделе пойдет речь только о простых преимущественно 3-замещенных индолах типа 3-индолилуксусной кислоты или серотонина, а не об алкалоидах с индольной структурой и подобных им сложных индолах.

Обнаруживать индолы очень легко, поскольку они чувствительны к кислотам и облучению и легко реагируют с различными реагентами, образуя окрашенные производные. Наибольшее распространение получил *реагент Эрлиха* (например, раствор 1 г *п*-диметиламинобензальдегида в 30 мл этанола, 30 мл соляной кислоты и 180 мл *н*-бутанола), под действием которого 3-замещенные индолы (производные скатола) в большинстве случаев дают синие пятна, а пятна других индолов окрашиваются иначе. После обработки *реагентом Сальковского* (ОР-24) обнаруживаются окрашенные флуоресцирующие пятна. Другой

Таблица 3.19

Величины R_f и цветные реакции различных алкалоидов [126]

Алкалоид	$R_f \cdot 100$		Окраска		
	керосин—диэтиламин (9 : 1)[а]	циклогексан—диэтиламин (9 : 1)[б]	при УФ-облучении	реактив Драгендорфа	иодоплатинат[в]
Морфин	15,6	31,7	Синяя	Оранжевая	Синяя
Кодеин	25,0	43,0	»	»	Фиолетовая
Тебаин	52,0	73,7	Розовая	»	Розовая
Героин	14,3	27,5	Синеватая	»	Темно-синяя
Апоморфин	35,6	62,5	Черная	Серо-черная	Розовая
Нарцеин	60,0	68,7		Оранжевая	Желтая
Иохимбин	62,5	78,1	Зеленая	Коричневая	Розовая
Папаверин	90,6	87,5	Зелено-желтая		
Наркотин	73,0	78,1	Темно-синяя	Оранжевая	Фиолетовая
Атропин	50,0	80,6		»	»
Гиосцин	33,7	46,8		Красная	Темно-фиолетовая
Гиосциамин	23,6	60,0		Оранжевая	Фиолетовая
Скополамин	32,5	43,7		Красная	Темно-фиолетовая
Стрихнин	42,0	70,0		Оранжевая	Фиолетовая
Бруцин	30,0	58,1		Желтая	Темно-синяя
Аконитин	98,7	98,7		Оранжевая	Желтая
Кокаин	62,5	75,0		Оранжевая	Розовая
Новокаин[в]	36,8	57,0		»	»
Хинин	62,5	78,7	Синяя	»	Фиолетовая
Физостигмин	50,0	82,5	Фиолетовая	Красная	Розовая
Никотин	16,8	26,2		Оранжевая	Фиолетовая
Ареколин	28,6	40,6		»	»
Берберин	46,8	54,3	Желтая	Желтая	»
Соланин	60,0	46,8			Розовая
Флексидил[в]	3,75	4,37			Красно-коричневая
Петидин	83,7	96,2			Красноватая
Спартеин	9,37	27,5			Синеватая
Цинхонин	48,1	77,5	Фиолетовая		Сине-черная
Гельземин	47,2	72,6			Коричневая

[а] Система растворителей C_1.
[б] Система растворителей C_2.
[в] Раствор 1 г $PtCl_4$ в 10 мл воды добавляют к раствору 60 г KI в 200 мл воды; реагент применяется свежеприготовленным.

приемлемый реагент — 1%-ный раствор нитрита натрия в 1 н. соляной кислоте (после опрыскивания хроматограмму нагревают при 100 °С, в результате появляются красные пятна). Можно также пользоваться *реагентом Прохазки* (ОР-25), под действием которого пятна индолов окрашиваются в цвета от желтого до оранжево-коричневого и большей частью дают исключительно интенсивную флуоресценцию желтого цвета. Флуоресценция такого цвета за очень немногими исключениями типична для остатков скатола. Подкисленные растворы других альдегидов, в основном ароматических, также образуют окрашенные продукты с индолами. Индолы, а также пирролы, имидазолы, тиазолы, карбазолы и т. п. реагируют также с диазониевыми солями, образуя окрашенные продукты. Чаще всего в качестве такого реагента используют диазотированную сульфаниловую кислоту (ОР-20).

Индолы отличаются друг от друга зарядом (кислые, основные и нейтральные индолы) и степенью гидрофильности, в соответствии с чем следует подбирать хроматографические системы растворителей. Для разделения большинства индолов растительного происхождения, например ауксинов, их промежуточных продуктов и производных, достаточно двух систем: щелочной смеси C_1 изопропиловый спирт — аммиак — вода (10 : 1 : 1) и кислой смеси C_2 тетрахлорметан — уксусная кислота (50 : 1). Последнюю систему, учитывая ее липофильный характер, следует применять для разделения на бумаге, хорошо насыщенной неподвижной фазой. Для этого надо до хроматографирования слегка опрыскать бумагу 30%-ной уксусной кислотой, дать испариться избытку кислоты и поместить еще влажную хроматограмму в камеру. Можно также оставить до следующего дня бумагу в камере, атмосфера которой насыщена парами тетрахлорметана, уксусной кислоты и воды.

Наиболее липофильные индолы, в частности индол, скатол и высшие гомологи, можно хроматографировать с помощью одной из наиболее липофильных систем Буша (см. разд. 3.5.6). Производные индола основного характера и более гидрофильные индолы, пирролы и имидазолы обычно хроматографируют насыщенным водой *н*-бутанолом, смесью Партриджа (см. разд. 3.5.2) или подобными растворителями. Приведем для примера величины R_f нескольких индолов, полученных в указанных выше системах C_1 и C_2: индол (0,79 и 0,88), индол-3-альдегид (0,72 и 0,10), индол-3-карбоновая кислота (0,21 и 0,13), 3-индолилацетонитрил (0,75 и 0,55), 3-индолилуксусная кислота или гетероауксин (0,25 и 0,24), γ-(3-индолил)масляная кислота (0,44 и 0,71), грамин (0,80; в C_2 разлагается), триптамин (0,65 и 0,00), триптофан (0,18 и 0,00), 5-окситриптамин или серотонин (0,51 и 0,00).

3.6.5. АМИНЫ

Низшие алифатические амины и аминоспирты можно хроматографировать и обнаруживать (с помощью нингидрина), так же как аминокислоты.

Нейзил и др. [91] нашли, что реакцию с нингидрином можно сделать весьма специфической, если сочетать ее с фотохимической реакцией, т. е. если после погружения в раствор нингидрина хроматограмму облучить. Для этого в темной комнате быстро погружают сухую хроматограмму в 0,5%-ный раствор нингидрина в ацетоне, 120 мин сушат на воздухе при комнатной температуре *в темноте*, после чего выставляют на 15 мин на солнечный свет или очень сильный искусственный свет. Многие первичные амины, в которых аминогруппа связана со вторичным углеродным атомом, реагируют медленно или только после облучения, так что их можно отличить от аминов других типов. Высшие амины следует хроматографировать в виде свободных оснований, применяя обращенно-фазные системы. Сложные эфиры холина можно хроматографировать смесью *н*-бутанол — этанол — уксусная кислота — вода (8 : 2 : 1 : 3) и обнаруживать хлоридом железа(III) после перевода в гидроксамовые кислоты или обработать 1%-ным раствором фосфомолибденовой кислоты в смеси этанола с хлороформом (1 : 1), промыть 15 мин водой и погрузить в 1%-ный раствор хлорида олова(II) в 3 н. соляной кислоте. Пятна эфиров при этом окрашиваются в синий цвет. Гуанидины можно хроматографировать в гидрофильных системах, например смеси *н*-бутанол — пиридин — вода (3 : 2 : 3), и обнаруживать *реагентом Джаффе* (разд. 3.5.5) или *реагентом Сакагучи* (разд. 3.6.1). Аминоспирты, гидразиды и семикарбазиды, а также производные мочевины хроматографируют в гидрофильных системах. Поскольку такие соединения хроматографируют редко, мы не будем касаться этого вопроса, а соответствующие данные читатель может найти в специальных монографиях по БХ. Недавно Тоул и др. [129] опубликовали статью, в которой описывается разделение 1,2-диоксимов и моноксимов на пропитанной формамидом бумаге с применением простых эфиров в качестве подвижных фаз. Для обнаружения они использовали 0,05 М растворы солей тяжелых металлов ($NiSO_4$, $CuSO_4$, $FeNH_4(SO_4)_2$), чаще всего в смеси с аммиаком, или 0,1 М раствор перманганата калия. Ароматические амины можно обнаружить при УФ-облучении хроматограммы или при обработке диазотированными аминами или реагентом Эрлиха (см. раздел об индолах) и т. п. Для разделения аминов данной группы чаще всего применяют кислые системы на основе *н*-бутанола.

Гаспарич и Шнобл [46] хроматографировали ароматические

п,п'-диамины типа $H_2N—C_6H_4—X—C_6H_4—NH_2$ ($X = —CH_2—$, $—CH_2—CH_2—$, —O—, —S—, —S—S— и др.) в системах, где неподвижной фазой служил формамид или диметилсульфоксид, а подвижной фазой — смесь бензола и гептана. Обнаружение эти авторы проводили посредством диазотирования парами оксида азота и опрыскивания раствором R-соли.

Пиридины обычно обнаруживают *реагентом Кенига* (ОР-23), т. е. смесью цианбромида и ароматического амина. Эта реакция избирательна в отношении пиридинов с незамещенным α-положением и очень чувствительна. Некоторые основания окрашиваются данным реагентом в красный цвет, а γ-пиколин — в сине-фиолетовый. Летучие производные пиридина обычно хроматографируют в кислых системах, например смеси этанол — соляная кислота — вода (20 : 1 : 2) или 1-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5). Пиридинкарбоновые кислоты лучше всего можно разделить в смеси *н*-бутанол — 1,5 н. аммиак (3 : 2) или 1-пропанол — вода (4 : 1) и т. п.

3.6.6. НИТРОСОЕДИНЕНИЯ

Нитросоединения поглощают в УФ-области. Эта особенность соединений данной группы значительно облегчает их обнаружение в УФ-области, особенно если бумагу предварительно опрыскивают раствором флуоресцеина. После опрыскивания щелочью нитросоединения превращаются в фиолетовые *аци*-нитропроизводные. Ароматические амины можно с достаточной чувствительностью обнаруживать посредством прямого восстановления их на бумаге (ОР-26), а также с помощью чувствительного реагента Эрлиха (ОР-15). Поскольку нитрогруппа содержит 2 кислородных атома, она в значительной степени полярна (гидрофильна), т. е. в этом отношении примерно соответствует гидроксильной группе. Поэтому выбирать растворители в этом случае следует исходя из соотношения числа углеродных атомов и числа нитрогрупп. Изомерные динитробензолы, динитронафталины, динитроантрахиноны, нитроксилолы, нитротолуолы, нитроэтилбензолы и некоторые нитрокрезолы можно хроматографировать в обращенно-фазных системах с керосином в качестве неподвижной фазы (пропитывающей жидкости) и смесью этанол — вода — уксусная кислота (20 : 14 : 1) в качестве подвижной фазы. Применяются также гидрофильные системы на основе бутанола с добавкой пиридина, аммиака, уксусной кислоты и т. д.

Урбанский и др. [132] обнаруживали эфиры азотной кислоты (нитраты) 0,5%-ным раствором тетраметил-*п*-фенилендиамина в ацетоне. Под действием этого реактива пятна нитратов окрашиваются в фиолетово-синий цвет; появление окраски можно ускорить, воздействуя УФ-облучением.

3.7. БУМАЖНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ СОЕДИНЕНИЙ, СОДЕРЖАЩИХ ДРУГИЕ ГЕТЕРОАТОМЫ

3.7.1. СЕРУСОДЕРЖАЩИЕ СОЕДИНЕНИЯ

Хроматографически эти соединения не отличаются существенно от кислородсодержащих. Вклад атома серы в полярность лишь ненамного меньше вклада атома кислорода. Однако наличие серы в молекуле позволяет использовать некоторые специфические обнаруживающие реагенты. Типичным реагентом для обнаружения таких соединений является *иодно-азидный* реагент (ОР-28), который реагирует с тиолами, тионами и дисульфидами, а также с определенными гетероциклическими серусодержащими соединениями.

Другой распространенный реагент на серусодержащие соединения — это *реагент Гроте,* предназначенный для обнаружения тиомочевин, тиогидантоинов и ксантатов. Приготавливают его следующим образом. В 10 мл воды растворяют 0,5 г гидрохлорида гидроксиламина, 1 г бикарбоната натрия и 0,5 г нитропруссида натрия. К раствору добавляют две капли брома, избыток которого удаляют, продувая воздух через раствор. Далее раствор фильтруют и разбавляют, доводя его объем до 25 мл. После опрыскивания этим реагентом дают бумаге почти полностью просохнуть и затем опрыскивают ее 10%-ным раствором карбоната натрия. В результате такой обработки появляются синие пятна. Можно также смешать оба раствора в соотношении 1 : 1 непосредственно перед употреблением. Зоны соединений, содержащих свободные тиольные группы, окрашиваются в фиолетовый цвет под действием раствора 1,5 г нитропруссида натрия в смеси 5 мл 2 н. серной кислоты и 95 мл метанола, к которому добавляют 10 мл 28%-ного аммиака. С помощью этого же реагента можно также обнаружить дисульфиды, если потом погрузить хроматограмму в раствор, содержащий 2 г цианида натрия в смеси 5 мл воды и 95 мл метанола.

Для обнаружения серусодержащих соединений широко применяют также аммиачный раствор нитрата серебра (ОР-2). С помощью этого реагента можно обнаруживать тиолы, тионы, сульфиды, изотиоцианаты, тиомочевины и т. п. Изотиоцианаты реагируют медленно. Наиболее общий метод обнаружения серусодержащих соединений разработан Йироусеком [62]. Применяя предложенный им способ, удается обнаруживать не только перечисленные выше соединения, но и сульфоны и сульфаты. Согласно разработанной этим автором методике, хроматограмму сначала погружают в темно-синий 3%-ный раствор металлического натрия в жидком аммиаке (лучше, однако, смачивать только одну сторону листа), а когда избыток аммиака испарит-

ся (через несколько секунд; при этом хроматограмма вновь становится белой), опрыскивают 2%-ным раствором нитропруссида натрия в воде. Этот метод не особенно приятен, и его используют только в тех случаях, когда надо доказать присутствие серы в данном пятне.

Сульфоновые кислоты можно обнаруживать, обрабатывая хроматограммы кислотно-основными индикаторами или просто нагревая их достаточно долго при повышенной температуре. Пятна сильных сульфоновых кислот при этом обугливаются.

Нафтолсульфоновые и нафтиламинсульфоновые кислоты настолько гидрофильны, что их можно хроматографировать в классической смеси *н*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5). Латинак [70] использовал бумагу, пропитанную 5%-ным раствором бикарбоната натрия, и проводил элюирование смесью (2 : 1) 1-пропанола с 5%-ным раствором бикарбоната натрия. В таких системах хорошо разделяются изомеры положения этих кислот, имеющие важное значение как промежуточные продукты синтеза органических красителей. Наибольшие значения R_f наблюдаются для таких изомеров, в молекулах которых заместители расположены близко друг к другу. Эти производные можно также обнаруживать с помощью растворов диазониевых солей.

Подобно другим спиртам, тиолы также можно хроматографировать в виде производных, например 3,5-динитробензоатов. Замещенные мочевины можно хроматографировать в системе хлороформ — вода, а различные изотиоцианаты — в еще более липофильных растворителях. Амфотерные сульфонамиды или соли изотиоурония можно хроматографировать в обычных гидрофильных системах. Широко применяют также бумагу, пропитанную буферным раствором. Меркаптопроизводные имидазолина, тиазолина, бензоимидазола и бензотиазола хроматографируют в насыщенном водой *н*-бутаноле и других полярных растворяющих системах. Диалкилполисульфиды и элементная сера настолько липофильны, что их следует хроматографировать в обращенно-фазных системах, а обнаруживать нитратом серебра или перманганатом калия.

3.7.2. ОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ ФОСФОРА

Эти соединения можно обнаруживать, опрыскивая хроматограммы молибдатом аммония (ОР-22) и обрабатывая их затем газообразным сероводородом. Эфиры фосфорных кислот можно обнаружить перманганатом калия, а триалкилфосфаты — смесью 2,5%-ного раствора $FeNH_4(SO_4)_2$, 5%-ного раствора тиоцианата аммония, 1 н. соляной кислоты и воды (10 : 40 : 1 : : 49).

Как и при разделении других органических соединений, выбор растворителей определяется полярностью хроматографируемых веществ.

3.8. ВИТАМИНЫ

Соединения этой группы настолько отличаются одно от другого по структуре, что для их разделения или обнаружения нельзя предложить какую-либо общую систему. Поскольку в большинстве случаев эти вещества уже давно были выделены и синтезированы, анализ их методом БХ уже не играет важной роли. Многие витамины можно определить спектральными и титриметрическими методами или в некоторых случаях с помощью биологических испытаний. БХ и ТСХ в этой области постепенно вытесняются жидкостной хроматографией высокого давления или газовой хроматографией, поэтому мы приведем некоторые методы обнаружения и растворяющие системы лишь с целью иллюстрации.

Витамины можно разделить прежде всего на липофильные и гидрофильные. Липофильные витамины — главным образом витамины A, D, E и K — чаще всего разделяют в обращенно-фазных системах, заранее пропитывая бумагу неполярной неподвижной фазой, например 5—10%-ным раствором парафинового масла в петролейном эфире (витамины A и K), 2,5%-ным раствором вазелина в эфире (витамин E) или 10%-ной суспензией силиконового смазочного масла в метиленхлориде (витамин E). Подвижными фазами служат водные спирты, например метанол, этанол, 1-пропанол, изопропанол (в случае необходимости с добавкой уксусной кислоты) или даже обводненный ацетонитрил. Витамины A и D целесообразнее всего обнаруживать реагентом Карра-Прайса (ОР-5). При обнаружении токоферолов используют их восстанавливающую способность или же обнаруживают их как фенольные соединения, например, опрыскивают последовательно 0,25%-ным раствором 2,2′-бипиридила в спирте, 0,1%-ным этанольным раствором хлорида железа(III) или диазотированным *о*-дианизидином, или нитратом серебра. Витамины K флуоресцируют красным цветом, а после опрыскивания 5%-ным раствором гидроксида натрия пятна их окрашиваются в разные цвета.

Другие витамины гидрофильны, и в большинстве случаев их можно хроматографировать с помощью систем на основе *н*-бутанола. Например, насыщенным водой *н*-бутанолом хроматографируют тиамины, липоевую кислоту, пиридоксин и его производные; смесь Партриджа (разд. 3.5.2) применяют для хроматографирования витамина C, пантотеновой кислоты и ее произ-

водных, рибофлавина и его производных и т. п. Кроме того, используют смесь бутанол — пиридин — вода и др.

Способ обнаружения гидрофильных витаминов зависит от их химической природы. *Тиамин* окисляют водным раствором 1% феррицианида калия и 0,6% карбоната натрия или каким-либо другим окислителем до образования сильно флуоресцирующего тиохрома. *Тиоктовая* (*α-липоевая*) *кислота* реагирует с индикаторами или реагентами, применяемыми для обнаружения серусодержащих соединений. Ее можно обнаружить также методом биоавтографии. *Рибофлавин* и его производные интенсивно флуоресцируют (рибофлавин сильно флуоресцирует желто-зеленым цветом), что и используется для их обнаружения. *Пиридоксин* и его производные обнаруживают методом биоавтографии с помощью *Saccharomyces calsbergensis* (4228) или применяют реагенты на фенолы (например, реагент Гиббса, см. разд. 3.5.5). Фосфорилированные производные гидролизуют на бумаге, далее опрыскивают хроматограмму раствором молибдата аммония (5 г на 100 мл воды и 30 мл концентрированной азотной кислоты), сушат при 50—55 °С, вновь опрыскивают раствором бензидина (100 мг в 10 мл уксусной кислоты и 90 мл воды), сушат при 37 °С и опрыскивают ацетатом аммония. В результате такой обработки на хроматограмме появляются синие пятна фосфатов. *Биотин* можно обнаружить биоавтографически, применяя различные штаммы (*Saccharomyces, Lactobacillus, Neurospora*). *Пантотеновую кислоту* также можно обнаружить посредством биоавтографии (*Saccharomyces*). Кроме того, можно прогреть хроматограмму при 160 °С, при этом выделяется свободный β-аланин, который обнаруживают нингидрином. Производные пантотеновой кислоты обнаруживают различными реагентами в зависимости от того, какой компонент связан с нею. *Фолиевую кислоту* и ее производные можно обнаружить с помощью биоавтографии. Можно также подвергнуть фолиевую кислоту восстановительному расщеплению трихлоридом титана. С этой целью смешивают 10%-ный раствор хлорида титана(III) в концентрированной соляной кислоте и 15%-ный раствор цитрата натрия в соотношении 1 : 1, опрыскивают хроматограмму этой смесью и оставляют на 24 ч. Выделившийся *п*-аминобензоат натрия обнаруживают посредством *реакции Маршалла*. Опрыскивают 0,2%-ным раствором нитрита натрия в 0,1 н. соляной кислоте, подсушивают и вновь опрыскивают 0,2%-ным раствором 1-нафтиламина в этаноле. Пятна при этом окрашиваются в красный цвет. *Никотинамид* и его производные можно обнаружить с помощью реагента Кенига, применяемого для обнаружения производных пиридина (OP-23). *Холин* можно обнаружить, обрабатывая хроматограмму парами иода или опрыскивая ее сначала свежим 1%-ным раствором феррицианида калия,

а затем 1%-ным раствором хлорида кобальта(II) или реагентом Драгендорфа (ОР-12). Холин дает зеленое пятно. Холин и его производные обнаруживают 0,2%-ным раствором дипикриламина в 50%-ном ацетоне (красные пятна на желтом фоне). *Витамин* B_{12} обнаруживают биоавтографически (*Escherichia coli* или *Lactobacillus lactic Dorner*). *Витамин С* обладает сильными восстанавливающими и кислотными свойствами, и поэтому его нетрудно обнаружить. Наиболее часто применяемыми и наиболее специфическими реагентами являются 0,1%-ный раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола в этаноле или аммиачный раствор нитрата серебра. Недавно Горниг [56] описал выделение аскорбиновой кислоты и ее производных на бумаге из стекловолокна элюированием системами на основе смеси ацетонитрил — бутиронитрил (60 : 30) с добавкой воды и (или) этанола. Хорошего разделения удается добиться всего за 10 мин, и при такой скорости хроматографирования окислительная деструкция этих нестойких соединений не успевает произойти. *Инозит* можно обнаружить с помощью нитрата серебра.

3.9. АНТИБИОТИКИ

К настоящему времени открыто очень много самых различных (и химически и биологически) антибиотиков, поэтому невозможно предложить какую-то универсальную систему для их хроматографии. Для обнаружения классических антибиотиков разработаны были в свое время химические цветные реакции, но обычно их обнаруживают методом биоавтографии. При разработке и идентификации новых антибиотиков стал традиционным метод определения их «хроматографических спектров» (профилей) посредством биоавтографии. Если установлено, что определенная среда проявляет свойства антибиотика по отношению к какому-либо бактериальному штамму, то эту среду или экстракт из нее хроматографируют в серии выбранных растворителей и подвергают хроматограммы (в виде полосок) биоавтографическому обнаружению (прижимают полоски к пленке с культурой и определяют зоны, в которых подавляется рост бактерий). Значения R_f пятен соединений, проявляющих свойства антибиотика, измеряют во всех растворяющих системах и строят кривую зависимости R_f от используемой системы (на оси ставят номера систем). Соединяя нанесенные точки, получают ломаную линию, которую и называют хроматографическим спектром или профилем. Этого обычно достаточно для получения полной хроматографической характеристики или для идентификации исследуемого антибиотика. Некоторые авторы используют до 14 растворителей для построения хроматографического спектра. В качестве примера приведем перечень систем, исполь-

зованных Дорнбергером и др. [33] для хроматографической характеристики нового полиенового антибиотика тетрамицина (в скобках указано соотношение объемов растворителей): *1*) — насыщенный водой бутанол; *2*) — 20%-ный раствор хлорида аммония; *3*) — 3%-ный раствор хлорида аммония; *4*) — 75%-ный водный фенол; *5*) — 50%-ный водный ацетон; *6*) — *н*-бутанол — метанол — вода — метиловый оранжевый (40 : 10 : 20 : 1,5 г); *7*) — *н*-бутанол — метанол — вода (40 : 10 : 20); *8*) — бензол — метанол (70 : 20); *9*) — вода; *10*) — *н*-бутанол — уксусная кислота — вода (40 : 10 : 50); *11*) — *н*-бутанол — пиридин — вода (60 : : 40 : 30); *12*) — диметилформамид — вода (10 : 90); *13*) — диметилформамид — вода (50 : 50); *14*) — 70%-ный водный пропанол. Состав других хроматографических систем см., например, в работах [4, 109, 116].

В качестве иллюстрации мы укажем ниже некоторые обнаруживающие и хроматографические системы, используемые для исследования антибиотиков. Ознакомиться с биоавтографическим методом обнаружения читатель может по обзорной статье Бетины [10]. *Пенициллины* можно разделить при хроматографировании влажным эфиром на бумаге, пропитанной фосфатным буферным раствором (0,1 М, pH 6,5), применяя нисходящее проточное элюирование. *Стрептомицины* очень гидрофильны, и их можно хроматографировать в насыщенном водой бутаноле, содержащем 2%-ную добавку *п*-толуолсульфокислоты. Величины R_f стрептомицинов малы, поэтому следует применять проточное элюирование. Если проба содержит соли, которые деформируют пятна, то следует насытить растворитель раствором хлорида натрия. Описана также методика хроматографирования на пропитанной сульфатом натрия бумаге с подвижной фазой состава метанол — 3%-ный водный раствор хлорида натрия. *Тетрациклиновые антибиотики* можно разделить в системе бутилацетат — метилизобутилкетон-*н*-бутанол — вода (5 : 15 : 2 : : 22). Пробы следует наносить на влажную бумагу, и в этом случае рекомендуется круговая хроматография. Для разделения эпимерных тетрациклиновых антибиотиков можно пользоваться смесью нитрометан — пиридин — хлороформ (20 : 3 : 10) и бумагой, пропитанной буферным раствором Макилвена с pH 3,5. Тетрациклины обнаруживают по их флуоресценции, интенсивность которой увеличивается в щелочной среде (под действием паров аммиака). Лучшей системой растворителей для *эритромицинов*, по-видимому, является смесь метанол — ацетон — вода (19 : 6 : 75). *Хлорамфеникол* можно хроматографировать с помощью системы бензол — метанол — вода (2 : 1 : 1) и обнаруживать, восстанавливая хлоридом олова(II) и опрыскивая реагентом Эрлиха (см. разд. 3.6.4).

В качестве микроорганизмов для биоавтографических испы-

таний чаще всего используют *Bacillus subtilis, Saccharomyces pastorianus, Candida albicans* или *Kloeckera apiculata.*

Хроматографии антибиотиков посвящен подробный обзор Уэгмена и Уэйнштейна [136а].

3.10. ДРУГИЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ

В этом разделе речь пойдет об органических соединениях всех других типов. Таких соединений чрезвычайно много. Это, например, и синтетические лекарственные вещества и их метаболиты, антиоксиданты, синтетические красители, синтетические полимеры, промежуточные продукты и размягчители и т. д. Рассмотреть методики хроматографирования всех этих соединений мы, безусловно, не сможем. Мы перечислим лишь наиболее важные работы в этой области и приведем несколько наиболее наглядных примеров хроматографирования некоторых групп соединений.

Вечеркова и др. (см., например, [78, 134, 135]) исследовали БХ многочисленных лекарственных средств и их метаболитов. Подборку литературы по БХ лекарственных средств можно найти в монографии Мацека [76]. Среди многочисленных статей, посвященных хроматографии лекарственных средств, приведем в качестве примеров обзоры Цимбуры [27] и Блажека и Стейскала [11], в которых рассматривается БХ фенотиазинов. Фенотиазины — сильные основания, в недиссоциированном виде они липофильны, поэтому для их хроматографирования пригодны обращенно-фазные системы. Однако с этой же целью можно также применять водные растворители, содержащие соли (см., например, [81]). Среди публикаций по хроматографии мочегонных средств следует указать статью Адама и Лапьера [1]. Эти авторы применяли хроматографирование на бумаге, пропитанной формамидом, подвижной фазой служила смесь хлороформ — *н*-амиловый спирт (4 : 1). Уанг и др. [139] хроматографировали пиперазиновые глистогонные лекарственные средства. О сульфонамидах уже говорилось в разделе, посвященном серусодержащим соединениям. Здесь следует указать еще статью Гарбера и др. [41], использовавших для разделения однофазные водные системы (например, смесь 0,2 н. раствора цитрата натрия и разбавленного аммиака), а для обнаружения — реагент Эрлиха. Эль-Дарави и Мобарак [35] хроматографировали антидепрессанты и противогистаминные лекарственные средства на изготовленной из карбоксиметилцеллюлозы ионообменной бумаге (СМ 82), применяя различные системы растворителей. Хроматография ЛСД и других производных лизергиновой кислоты рассматривается в статье Кларка [28].

При хроматографировании синтетических красителей не требуется специального обнаружения, поскольку они хорошо видны

на бумаге. Эти соединения относятся к самым различным структурным типам, и мы ограничимся лишь тем, что приведем литературные ссылки [20, 32, 42, 44, 45]. Относительно недавно Анет [3] опубликовал статью по методам обнаружения антиоксидантов.

3.11. БУМАЖНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ НЕОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

М. ГЕЙТМАНЕК

В последние двадцать лет БХ зарекомендовала себя также как эффективный метод разделения неорганических соединений. Об этом свидетельствует появление большого числа статей и ряда монографий [50, 51, 72, 73, 74, 84, 102]. Чаще всего БХ применяется для количественного микроанализа смесей ионов, выделения из смесей определенных ионов и их идентификации, а также для исследования и получения комплексных неорганических соединений. Скорость перемещения ионов в данной хроматографической системе зависит от электронной структуры, размеров, заряда и степени сольватации, потому что от этих параметров зависит характер частиц, образуемых этими ионами, и, следовательно, также коэффициенты распределения ионов между обеими фазами.

Неорганические соединения чаще всего анализируют методом распределительной хроматографии на непропитанной бумаге, причем роль неподвижной фазы выполняет вода. Обычно основным компонентом подвижной фазы служит какой-либо органический растворитель, содержащий в составе полярной группы азот или кислород. При разделении катионов к подвижной фазе часто добавляют комплексообразующий реагент, например галогеноводороды, бензоилацетон и т. п. Эффективность разделения катионов зависит от устойчивости комплексов, их фазового равновесия, а также от кинетики их образования. В последнее время стали широко применять ионообменную осадительную хроматографию. Для этих типов хроматографии используют пропитанную или химически обработанную бумагу. Помимо имеющихся в продаже марок ионообменной бумаги, используют также бумагу, специально пропитанную жидкими ионообменниками, например три-*н*-октиламином, неорганическими ионообменниками, например фосфатом циркония, органическими комплексообразующими и осаждающими реагентами, например оксином и т. д. В качестве подвижной фазы используют также водные растворы, часто с добавкой комплексообразующих реагентов.

Методика элюирования похожа на методику элюирования органических соединений: чаще всего это одномерное восходя-

щее элюирование. Обычно достаточно элюирование на небольшом расстоянии. Для качественного анализа пригодна круговая хроматография благодаря быстроте проведения хроматографирования и возможности обнаружения с применением различных реагентов. В этом методе центрифугированием можно ускорить продвижение элюента. Для разделения микрограммовых количеств наиболее удобны сорта бумаги, эквивалентные по толщине листа и скорости подъема растворителя бумаге ватман № 1. Для количественных работ необходимо использовать предварительно промытую бумагу, освобожденную от обычных неорганических примесей (Na, Ca, Mg, Cu, Fe).

Методы обнаружения ионов можно разделить на химические и физические. Для химического обнаружения используют реагенты, применяемые в качественном неорганическом анализе. Разделенные ионы можно обнаружить с помощью универсальных реагентов, вступающих в характерные реакции с исследованными ионами; для разделения индивидуальных ионов и подтверждения их наличия можно пользоваться избирательными, или специфическими, реагентами. Для обнаружения пригоден ряд реагентов, указанных в монографиях, посвященных качественному анализу методом БХ [36, 93, 124]. Особенно чувствительны органические реагенты. Предел обнаружения органическими реагентами составляет 0,1 мкг, если используется цветная реакция, и 0,01 мкг, если продукты реакции флуоресцируют.

Из числа физических способов обнаружения наиболее чувствительны радиометрические методы, которые прежде всего удобно применять для анализа радиоизотопов. При обнаружении неактивных веществ используют реагенты, содержащие радиоизотоп. Для определения положения ионов можно использовать, например, низко- или высокочастотную кондуктометрию, полярографию и т. п. Физические методы можно применять для непосредственного анализа хроматограмм. Наиболее употребительна фотометрия обнаруженных окрашенных пятен в отраженном или проходящем свете. Точность определения содержания ионов повышается, если эти ионы экстрагируют с хроматограммы и анализируют элюат удобным и чувствительным методом, например колориметрическим, или методом атомно-абсорбционной спектроскопии.

3.11.1. ПРИМЕРЫ РАЗДЕЛЕНИЯ И ОБНАРУЖЕНИЯ АНИОНОВ

ЩЕЛОЧНЫЕ МЕТАЛЛЫ

Литий, натрий и калий можно четко разделить на необработанной бумаге в виде хлоридов, применяя восходящее элюирование метиловым спиртом [24] (R_f: K 0,22; Na 0,44; Li 0,72)

или смесью этанола с водой (9 : 1) [24]. Калий, рубидий и цезий можно отделить один от другого при элюировании фенолом, насыщенным 20%-ной соляной кислотой [121]. Для разделения щелочных металлов используется восходящая хроматография на полоске бумаги, пропитанной фосфомолибдатом аммония [2]. Сначала пробу элюируют раствором 0,1 *М* азотной кислоты и 0,2 *М* нитрата аммония. При этом цезий и рубидий (R_f 0,00 и 0,06) отделяются от калия (R_f 0,27) и смеси натрия и лития (R_f 0,73 и 0,78). Далее разрезают полоску на три части. На средней части проводят обнаружение калия. Нижнюю часть повторно хроматографируют смесью 0,2 *М* азотной кислоты и 3,5 *М* нитрата аммония, чтобы отделить цезий (R_f 0,1) от рубидия (R_f 0,6). Верхнюю часть повторно хроматографируют 96%-ным этанолом, чтобы отделить натрий от лития. Щелочные металлы обнаруживают, например, с помощью виолуровой кислоты или, если они были разделены в форме хлоридов, нитрата серебра. Виолуровую кислоту используют в виде 0,1%-ного раствора; после опрыскивания хроматограмму нагревают при 60 °С. При этом пятна натрия и калия окрашиваются в фиолетовый цвет, пятна лития — в красно-фиолетовый. Этот реагент окрашивает также пятна ряда других металлов. Обнаружение с помощью нитрата серебра носит косвенный характер: образующийся хлорид серебра темнеет на свету.

ЩЕЛОЧНОЗЕМЕЛЬНЫЕ МЕТАЛЛЫ

Ионы Ca, Sr, Ba и Mg можно четко разделить методом круговой хроматографии на непропитанной бумаге при элюировании смесью метанола и этанола (1 : 1) и обнаружить, например, с помощью виолуровой кислоты или 8-оксихинолина [6].

НИКЕЛЬ, КОБАЛЬТ, МЕДЬ

Эту смесь элементов удается четко разделить на непропитанной бумаге, элюируя ее смесями растворителей на основе кетона или тетрагидрофурана с добавкой соляной кислоты. Подвижность возрастает с увеличением стабильности хлорокомплексов в следующем порядке: Ni$<$Co$<$Cu; никель обычно остается у стартовой линии. Примеры эффективных растворяющих систем: ацетон — 6 н. соляная кислота (19 : 1) [140] или ацетон — бутанол — конц. соляная кислота — ацетилацетон (28 : 15 : 6 : 1) [133]. Обнаружение лучше всего проводить опрыскиванием 0,5%-ным раствором рубеанового водорода в этаноле и после опрыскивания подержать хроматограмму в парах аммиака. В результате пятна никеля окрашиваются в синий цвет, пятна кобальта — в желто-коричневый, пятна меди — в оливково-зеле-

ный. Этот метод обнаружения пригоден также для количественного определения, например, кобальта в сплавах посредством фотометрического сравнения пятен пробы и стандартов [133].

НИОБИЙ И ТАНТАЛ

Эти элементы лучше всего разделять на непропитанной бумаге в виде фторидов, элюируя пробу одной из следующих двух растворяющих систем: диэтилкетон, насыщенный водным раствором 2,2 н. плавиковой кислоты, +2 н. азотная кислота (R_f: Nb 0,55; Ta 1,0) [80] или смесь 100 мл метилизобутилкетона с 3 мл 40%-ной плавиковой кислоты (R_f: Nb 0,1; Ta 0,87). Разделение во второй системе используют также для количественного определения обоих элементов в стали; сначала химически выделяют эти элементы в виде оксидов, которые затем переводят во фториды и разделяют хроматографически. Обнаруживать и количественно определять эти элементы можно, например, с помощью 8-оксихинолина [111].

РЕДКОЗЕМЕЛЬНЫЕ МЕТАЛЛЫ

Эти элементы наиболее эффективно удается разделить на бумаге, пропитанной ионообменниками или нитратом аммония. На сильнокислой катионообменной бумаге Sa-2 можно разделить лантан, церий и неодим методом центрифужной круговой хроматографии, используя для элюирования 0,4*M* раствор гликолята (pH 3,75) [54]. Смесь Ce, Pr, Nd, Sm и Gd разделяют на анионообменной бумаге ватман DE-20 0,15*M* раствором азотной кислоты в 99%-ном метаноле (R_f: Ce 0,06; Pr 0,12; Nd 0,21; Sm 0,40; Gd 0,60) [23]. Для разделения 10 редкоземельных элементов и иттрия используют бумагу, пропитанную 10%-ным раствором нитрата аммония. Элюируют пробу смесью ацетона и эфира (1 : 1) с добавками роданида аммония и соляной кислоты, а обнаруживают опрыскиванием насыщенным раствором ализарина в 96%-ном спирте. Порядок расположения пятен элементов соответствует порядку возрастания их атомных масс. Величины R_f увеличиваются в ряду La 0,08; Ce 0,11; Pr 0,16; Nd 0,20; Sm 0,31; Gd 0,44; Y 0,49; Dy 0,50; Er 0,56; Yb 0,59; Tm 0,90 [71].

ТОРИЙ, УРАН, ЛАНТАН

Смесь этих элементов можно разделить на бумаге, пропитанной три-*н*-октиламином, элюируя пробу 2*M* раствором нитрата аммония [22] (R_f: Th 0,10; U 0,51; La 0,87).

ВЫДЕЛЕНИЕ ОДНОГО ИЛИ ДВУХ ЭЛЕМЕНТОВ ИЗ СМЕСИ

Для этой цели используют ионообменную бумагу. Шерма [112—115] предложил для избирательного выделения различных катионов ряд элюирующих растворителей, применимых в сочетании с определенными марками ионообменной бумаги.

3.11.2. ПРИМЕРЫ РАЗДЕЛЕНИЯ И ОБНАРУЖЕНИЯ КАТИОНОВ

Смеси анионов обычно разделяют в виде натриевых солей. Если в пробе содержатся катионы, мешающие разделению, то сначала нужно заместить их на катионообменнике натрием.

ГАЛОГЕНИДЫ

Для разделения на непропитанной бумаге пригодны растворители на основе ацетона или пиридина и воды; применяя водную подвижную фазу, можно разделить галогениды на бумаге, пропитанной сильноосновным анионообменником или солью серебра. В табл. 3.20 приведены хроматографические системы и величины R_f.

Таблица 3.20

Величины R_f галогенид-ионов

Анион	Ацетон — вода (4 : 1) [17]	Пиридин — вода (9 : 1) [17]	Ацетон — пиридин — вода (4 : 2 : 1) [16]	1M KNO_3[a] [94]
Фторид	0,25	0,0	0,0	0,66
Хлорид	0,50	0,23	0,20	0,43
Бромид	0,61	0,47	0,36	0,12
Иодид	0,77	0,72	0,69	—

[a] Ионообменная бумага амберлит SB-2.

ХЛОРИД, ХЛОРИТ, ХЛОРАТ И ПЕРХЛОРАТ

Эти анионы можно разделить следующим элюирующим растворителем: 2-пропанол — вода — пиридин — конц. аммиак (15 : 2 : 2 : 2) [52] (R_f: Cl^- 0,25; ClO_2^- 0,36; ClO_3^- 0,54; ClO_4^- 0,71). Ионы хлора обнаруживают в виде AgCl, ClO_2^- и ClO_3^- — дифениламином, ClO_4^- — метиленовой синью.

ФОСФАТЫ

Разделение орто-, пиро- и трифосфатов, высших полифосфатов и метафосфатов в виде натриевых солей можно проводить на непропитанной бумаге, применяя для элюирования спирто-

Таблица 3.21

Величины R_f фосфат-ионов

Система растворителей[a]	PO_4^{3-}	$P_2O_7^{4-}$	$P_3O_{10}^{5-}$	$P_4O_{13}^{6-}$	$P_5O_{16}^{7-}$	$P_6O_{19}^{8-}$	$P_7O_{22}^{9-}$	$P_3O_9^{3-}$	$P_4O_{12}^{4-}$
C_1	0,65	0,44	0,29	0,17	0,11	0,07	0,04	0,20	0,08
C_2	0,73	0,50	0,38	0,25	0,18	0,13	0,09	0,21	0,13
C_3	0,79	0,68	0,58	0,47	0,36	0,25	0,15	0,39	0,22

[a] C_1 — 75 мл изопропилового спирта, 25 мл воды, 5 г трихлоруксусной кислоты, 0,3 мл 25%-ного аммиака [34]; C_2 — 70 мл изопропилового спирта, 10 мл воды, 20 мл 20%-ной трихлоруксусной кислоты, 0,3 мл 25%-ного аммиака [127]; C_3 — 60 мл метанола, 10,3 мл раствора трихлоруксусной кислоты (100 г кислоты+22,7 мл 25%-ного аммиака+ +500 мл воды), 5 мл раствора уксусной кислоты (20 мл ледяной уксусной кислоты на 80 мл воды) [97].

вые растворы трихлоруксусной кислоты. Примеры элюирующих смесей и значения R_f приведены в табл. 3.21. Обнаруживающим реагентом служит 1%-ный раствор молибдата аммония, к 100 мл которого добавляют 5 мл 60%-ной хлорной и 1 мл концентрированной соляной кислоты. После опрыскивания этим реагентом хроматограмму сушат при 60—70 °С, чтобы гидролизовать полифосфаты до ортофосфатов. Синие пятна фосфорномолибденовой сини появляются или после УФ-облучения, продолжающегося в течение нескольких минут, или после восстановления хлоридом олова(II). Количественные определения проводят колориметрическим методом после экстрагирования пятен с хроматограммы.

3.12. КОЛОНКИ С ЦЕЛЛЮЛОЗОЙ

Хроматография на колонках, заполненных целлюлозой, почти целиком утратила свое значение, и в настоящее время ею пользуются лишь в особых обстоятельствах. В этих случаях применяют главным образом чистую порошкообразную целлюлозу производства фирмы Whatman. Она служит носителем неподвижной фазы. Неподвижную фазу фиксируют на носителе, например посредством пропитки, которую проводят или перед набивкой колонки, или уже непосредственно в колонке. В последнем варианте жидкость, образующую неподвижную фазу, пропускают через заполненную колонку, а избыток пропитывающей жидкости (неподвижной фазы) вытесняют затем подвижной фазой. Однако предварительно необходимо взаимно насытить обе фазы. Хроматографирование можно начинать лишь

после того, как из колонки начнет вытекать чистая подвижная фаза. Набивку колонки обычно проводят, уплотняя небольшие количества сухого целлюлозного порошка перфорированным поршнем. Эту же операцию можно проводить и в колонках, заполненных растворителем.

Фирма LKB-Produkter AB (Стокгольм) поставляет под названием «хромакс» готовые колонки с целлюлозой (например, в виде рулонов хроматографической бумаги в полиэтиленовой обертке), которые вставляются в двустенную рубашку с наружной стенкой из стали и внутренней из резины.

Поскольку в настоящее время в продажу поступают более однородные и химически четко определенные синтетические материалы, обладающие более узким распределением частиц по размерам, чем целлюлоза, то лучше в качестве неподвижных фаз или носителей использовать эти материалы, например сефадексы. В настоящее время колонки с целлюлозой почти не применяют для аналитических целей; этот вид хроматографии полностью вытеснила высокоэффективная жидкостная колоночная хроматография [31].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Adam R., Lapiere C. L.*, J. Pharm. Belg., **19**, 79 (1964).
2. *Alberti G., Grassini G.*, J. Chromatogr., **4**, 423 (1960).
3. *Anet E. F. L. J.*, J. Chromatogr., **63**, 465 (1971).
4. *Argoudelis A. D., Reusser F.*, Antibiotics, **24**, 383 (1971).
5. *Armstrong M. D., Shaw K. N. F., Wall P. E.*, J. Biol. Chem., **218**, 293 (1956).
6. *Barnabas T., Badve M. G., Barnabas J.*, Anal. Chim. Acta, **12**, 542 (1955).
7. *Bate-Smith E. C., Westall R. G.*, Biochim. Biophys. Acta, **4**, 427 (1950).
8. *Bauer C., Bachman W., Reutter W.*, Z. Physiol. Chem., **353**, 1053.
9. *Bergkvist R., Deutsch A.*, Acta Chem. Scand., **8**, 1880 (1954).
10. *Betina V.*, J. Chromatogr., **78**, 41 (1973).
11. *Blažek J., Stejskal Z.*, Pharmazie, **27**, 506 (1972).
12. *Borecký J., Gasparič J.*, Collection Czech. Chem. Commun., **25**, 1287 (1960).
13. *Borecký J., Gasparič J., Večeřa N. M.*, Collection Czech. Chem. Commun., 24, 1822 (1959).
14. *Bourne E. J., Lees E. M., Weigel H.*, J. Chromatogr., **11**, 253 (1963).
15. *Brawerman E., Chargaff E.*, J. Biol. Chem., **210**, 445 (1954).
16. *Broomhead J. A., Gibson N. A.*, Anal. Chim. Acta, **26**, 265 (1962).
17. *Burstall F. H., Davies G. R., Linstead R. P., Wells R. A.*, J. Chem. Soc., **1950**, 516.
18. *Bush I. E.*, The Chromatography of Steroids, Pergamon, London, 1961.
19. *Bush I. E., Crowshaw K.*, J. Chromatogr., **19**, 114 (1965).
20. *Cee A., Gasparič J.*, Collection Czech. Chem. Commun., **33**, 1091 (1968).
21. *Cerbulis J.*, Anal. Chem., **27**, 1400 (1955).
22. *Cerrai E., Testa C.*, J. Chromatogr., **5**, 442 (1961).
23. *Cerrai E., Triulzi C.*, J. Chromatogr., **16**, 365 (1964).
24. *Chakrabarti S., Burma D. P.*, Sci., Culture (India), **16**, 485 (1951).
25. *Churáček J., Hušková M., Pechová H., Říha J.*, J. Chromatogr., **49**, 511 (1970).

26. *Churáček J., Říha J., Jureček M.*, Z. Anal. Chem., **249**, 120 (1970).
27. *Cimbura G.*, J. Chromatogr. Sci., **10**, 287 (1972).
28. *Clarke E. G. C.*, Forensic Sci. Soc. J., **7**, 46 (1967).
29. *Consden R., Gordon A. H., Martin A. J. P.*, Biochem. J., **38**, 224 (1944).
30. *Consden R., Gordon A. H., Martin A. J. P.*, Biochem., J., **41**, 590 (1947).
31. Жидкостная колоночная хроматография. Пер. с англ./Под ред. З. Дейла, К. Мацека, Я. Янака. — М.: Мир, 1978.
32. *Dobrecky J., De Carnevale Bonino R. C. D.*, Rev. Farm (Buenos Aires), **114**, 21 (1972); Chem. Abstr., **77**, 105671 (1972).
33. *Dornberger K., Fügner R., Bradler G., Thrum H.*, J. Antibiotics, **24**, 172 (1971).
34. *Ebel J. P., Volmar Y., Jacoub B.*, Compt. Rend., **235**, 372 (1952).
35. *El-Darawy Z. I., Mobarak Z. M.*, Pharmazie, **28**, 37 (1973).
36. *Feigl F.*, Spot Tests in Inorganic Analysis, 5th Ed., Elsevier, Amsterdam, 1958.
37. *Fischer F. G., Dörfel H.*, Biochem. Z., **324**, 544 (1953).
38. *Franc J., Pospíšilová K.*, J. Chromatogr., **66**, 329 (1972).
39. *Franc B.*, Chem. Ber., **91**, 2803 (1958).
40. *Gage T. B., Douglas C. D., Wender S. H.*, Anal. Chem., **23**, 1583 (1951).
41. *Garber C., Assem de Juarez E. M.*, Rev. Asoc. Bioquim. Argent., **36**, 209 (1971).
42. *Gasparič J.*, Collection Czech. Chem. Commun., **34**, 3075 (1969).
43. *Gasparič J., Borecký J.*, J. Chromatogr., **4**, 138 (1960).
44. *Gasparič J., Gemzová I.*, J. Chromatogr., **35**, 362 (1968).
45. *Gasparič J., Kadlecová J.*, Chem. Listy, **66**, 1090 (1972).
46. *Gasparič J., Šnobl D.*, Scientific Papers Univ. Chim. Technol. (Pardubice), **25**, 33 (1971).
47. *Gasparič J., Večera M.*, Collection Czech. Chem. Commun., **22**, 1426 (1957).
48. *Geissmann T. A.*, Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, III (Ed. Peach K., Tracey M. V.), Springer Verlag, Berlin, 1955, p. 476.
49. *Gentili B., Horowitz R. M.*, J. Chromatogr., **63**, 467 (1971).
50. *Hais I. M., Macek K.* (Eds.), Paper Chromatography, Publ. House of the Czechoslov. Acad. Sci., Prague, 1963.
51. *Hais I. M., Macek K.* (Eds.), Papirová chromatografie, ČSAV, Praha, 1959.
52. *Harrison B. L., Rosenblatt D. H.*, J. Chromatogr., **13**, 271 (1964).
53. *Hartley B. S.*, Biochem. J., **119**, 805 (1970).
54. *Heininger C., Lanzafama F. M.*, Anal. Chim. Acta, **30**, 148 (1964).
55. *Hirst E. L., Jones J. K. N.*, J. Chem. Soc., **1949**, 1659.
56. *Hornig D.*, J. Chromatogr., **71**, 169 (1972).
57. *Hough L., Jones J. K. N., Wadman W. H.*, J. Chem. Soc., **1950**, 1702.
58. *Howe J. R.*, J. Chromatogr., **3**, 389 (1960).
59. *Ingram P., Applegarth D. A., Sturrock A., White J. N. C.*, Clin. Chim. Acta, **35**, 523 (1971).
60. *Isherwood F. A., Hanes C. S.*, Biochem. J., **55**, 824 (1953).
61. *Jeanes A., Wise C. S., Dimler R. J.*, Anal. Chem., **23**. 415 (1951).
62. *Jirousek L.*, Chem. Listy, **52**, 1533 (1958).
63. *Kariyone T., Hashimoto Y., Kimura M.*, Nature, **168**, 511 (1951).
64. *Kaufmann H. P., Kessen G.*, Z. Physiol. Chem., **317**, 43 (1959).
65. *Keil B.*, Chem. Listy, 48, 725 (1954); Collection Czech. Chem. Commun., **19**, 1006 (1954).
66. *Клячко-Гурвич Г. Л., Семененко В. Е., Верещагин А. Г.*, Биохимия, **35**, 808 (1970).
67. *Knight C. S.*, Advanc. in Chromatogr., **4**, **61** (1967).
68. *Koštir J., Slavík K.*, Collection Czech. Chem. Commun., **15**, 17 (1950).
69. *Lambou M. G.*, Anal. Chem., **29**, (1449) (1957).
70. *Latinák J.*, Collection Czech. Chem. Commun., **26**, 403 (1961).

71. *Лауэр Р. С., Полуэктов Н. С.*, Завод. лаб., **25**, 403 (1961).
72. *Lederer E., Lederer M.*, Chromatography, 2nd Ed., Elsevier, Amsterdam, 1957, p. 493.
73. *Lederer M.*, Inorganic Paper Chromatography: Chromatographic Reviews, vol. 3, Elsevier, Amsterdam, 1961.
74. *Lederer M., Michl H., Schlögl K., Siegel A.*, Anorganische chromatographische Methoden, in «Handbuch der mikrochemischen Methoden», Vol. 3 (Hecht F., Zacherl M. K., Eds.), Springer Verlag, Vienna, 1961.
75. *Lestrange R. I., Müller R. H.*, Anal. Chem., **26**, 953 (1954).
75a. *Liteanu C., Gocan S.*, Talanta, **17**, 1115 (1970).
76. *Macek K.* (Ed.), Pharmaceutical Applications of Thin-Layer and Paper Chromatography, Elsevier, Amsterdam, 1972.
76a. *Macek K., Rečvářová H.*, Chromatogr. Revs., **15**, 1 (1971).
77. *Macek K., Hais I. M.*, Bibliografie papírové chromatografie, Nakladatelství ČSAV, Prague, 1960.
78. *Macek K., Večerková J.*, Pharmazie, **20**, 605 (1965).
79. *Markham R., Smith J. D.*, Biochem. J., **52**, 552 (1952).
80. *Martin I., Magee R. J.*, Talanta, **10**, 1119 (1963).
81. *Mellinger T. J., Keeler C. E.*, J. Pharm. Sci., **51**, 1169 (1962).
82. *Menzies I. S.*, J. Chromatogr., **81**, 109 (1973).
83. *Metzenberg R. L., Mitchell H. K.*, J. Am. Chem. Soc., **76**, 4187 (1954).
84. *Michal J.*, Inorganic Chromatographic Analysis, Van Nostrand Reinhold, London, 1973.
85. *Micheel F., Leifels W.*, Chem. Ber., **91**, 1212 (1958).
86. *Mikeš O.*, Chem. Listy, **51**, 138 (1957); Collection Czech. Chem. Commun., **22**, 831 (1957).
87. *Mikeš O.* (Ed.), Laboratory Handbook of Chromatographic Methods, Van Nostrand, London, 1966.
88. *Mikeš O., Holeyšovský V.*, Chem. Listy, **51**, 1367 (1957); Collection Czech. Chem. Commun., **23**, 524 (1958).
89. *Myhre D. V., Smith F.*, J. Org. Chem., **23**, 1229 (1958).
90. *Neher R.*, Steroid Chromatography, 2nd Ed., Elsevier, Amsterdam, 1964.
91. *Neuzil E., Josselin J., Vidal Y.*, J. Chromatogr., **56**, 311 (1971).
92. *Nover L., Baumgarten G., Luckner M.*, J. Chromatogr., **32**, 93, 123, 141 (1968).
93. *Okáč A.*, Analytická chemie kvalitativni, ČSAV, Praha, 1957.
94. *Ossicini L.*, J. Chromatogr., **9**, 114 (1962).
95. *Partridge S. M.*, Biochem. J., **42**, 238 (1948).
96. *Patel J. M., Patel N. B.*, Marathwada Univ. J. Sci., **10** (3), A5 (1971); Chem. Abstr., **77**, 103607, (1972).
97. *Pfrengle O.*, Z. Anal. Chem., **158**, 81 (1957).
98. *Pilný J., Svoltková E., Juřicová M., Deyl Z.*, J. Chromatogr., **78**, 161 (1973).
99. *Pischel H., Holý A., Wagner G.*, Collection Czech. Chem., Commun., **37**, 3475 (1972).
100. *Pocock D. M.-E., Rafal S., Vost A.*, J. Chromatogr. Sci., **10**, 72 (1972).
101. *Pokorný J., Phan-Trong Tai, El-Tarra M. F., Janíček G.*, J. Chromatogr., **60**, 272 (1971).
102. *Pollard F. H., McOmie J. F. W.*, Chromatographic Methods of Inorganic Analysis, Butterworths, London, 1953, p. 94.
103. *Procházka Z.*, Bull. Chem. Soc. (Belgrad), **30**, 217 (1965).
104. *Procházka Z.*, Chem. Listy, **68**, 911 (1964).
105. *Procházka Z.*, Partition Chromatography, in Mikeš O. (Ed.), «Laboratory Handbook of Chromatographic Methods», Van Nostrand, London, 1966.
106. *Reichel L., Schiweck H.*, Pharmazie, **28**, 39 (1973).
107. *Reindel F., Hoppe W.*, Chem. Ber., **87**, 1103 (1954).
108. *Reio L.*, J. Chromatogr., **1**, 338 (1958); **4**, 458 (1960); **13**, 475 (1961); **47**, 60 (1970).

109. *Schlegel R., Thrum H.*, J. Antibiotics, **24**, 360 (1971).
110. *Schneider J. J.*, J. Chromatogr., **54**, 97 (1971).
111. *Scott J. A., Magee R. J.*, Talanta, **1**, 239 (1958).
112. *Sherma J.*, Anal. Chem., **36**, 690 (1964).
113. *Sherma J.*, Talanta, **9**, 775 (1962).
114. *Sherma J.*, Talanta, **11**, 1373 (1964).
115. *Sherma J., Cline C. W.*, Talanta, **10**, 787 (1963).
116. *Shimi I. R., Dewedar A., Abdullah N.*, J. Antibiotics, **24**, 283 (1971).
117. *Singh E. J., Celic L., Swartwout J. R.*, J. Chromatogr., **63**, 321 (1971).
118. *Smith M., Drummond F. I., Khorana H. G.*, J. Am. Chem. Soc., **83**, 698 (1961).
119. *Söll D., Khorana H. G.*, J. Am. Chem. Soc., **87**, 352 (1965).
120. *Spackman D. H., Stein W. H., Moore S.*, J. Biol. Chem., **235**, 648 (1960).
121. *Steel A. E.*, Nature, **1973**, 315 (1954).
122. *Sundt E., Winter M.*, Anal. Chem., **29**, 851 (1957).
123. *Šanda V., Procházka Ž., Le Moal H.*, Collection Czech. Chem. Commun., **24**, 420 (1959).
124. *Tananajev N. A.*, Kapková analýza anorganických látek, SNTL, Praha, 1957.
125. *Tanimura T., Kasai Y., Tamura Z.*, Chem. Pharm. Bull (Japan), **20**, 1845 (1972).
126. *Tewari S. N.*, Pharmazie, **26**, 163 (1971).
127. *Thilo E., Grunze H.*, J. Chromatogr., **1**, 389 (1958).
128. *Tirimanna A. S. L., Perera K. P. W. C.*, J. Chromatogr., **58**, 302 (1971).
129. *Toul J., Pardta J., Okáč A.*, J. Chromatogr., **57**, 107 (1971).
130. *Tung K. K., Rosenthal A., Nordin J. H.*, J. Biol. Chem., **246**, 6722 (1971).
131. *Turina S., Klasinc L., Jamnicki V.*, Chromatographia, **7**, 203 (1974).
132. *Urbański T., Krasiejko T., Poludnikiewicz W.*, J. Chromatogr., **84**, 218 (1973).
133. *Vaeck Sv. V.*, Anal. Chim. Acta, **12**, 443 (1955).
134. *Večerková J.*, Českoslov. Farm., **19**, 3, 45 (1970).
135. *Večerková J., Kakáč B., Večerek B., Ledvina M.*, Pharmazie, 22, 30 (1967).
136. *Vestergaard P.*, in Heftmann E. (Ed.), Modern Methods of Steroid Analysis, Academic Press, New York, 1973, p. 1.
137. *Waldi D.*, in «Some General Problems of Paper Chromatography», Publ. House of the Czechosl. Acad. Sci., Prague, 1962, p. 139.
138. *Waley S. C., Watson J.*, Biochem. J., **55**, 328 (1953).
139. *Wang R. T., Jen H. C., Tsai Y. H., Hua Hsueh*, 24 (1971); Chem. Abstr., **75**, 67517 (1971).
140. *Warren G. W., Fink R. W.*, J. Inorg. Nuclear Chem., **2**, 176 (1956).
141. *Wieland T., Berg A.*, Angew. Chem., **64**, 418 (1952).
142. *Wieland T., Kawerau E.*, Nature, **168**, 77 (1951).
143. *Wilkie K. C. B.*, in Mikeš O. (Ed.), Laboratory Handbook of Chromatographic Methods», Van Nostrand, London, 1966 p. 70.
144. *Wong E., Taylor A. O.*, J. Chromatogr., **9**, 449 (1962).
145. *Wyatt G. R.*, Biochem. J., **48**, 584 (1957).
146. *Zweig G., Hood S. L.*, Anal. Chem., **29**, 438 (1957).

Глава 4. Адсорбционная колоночная хроматография

О. МОТЛ, Л. НОВОТНЫЙ

Институт органической химии и биохимии Чехословацкой Академии наук, Прага

4.1. ВВЕДЕНИЕ

Адсорбционная хроматография, старейший хроматографический метод, ведет свое начало с классических исследований Цвета [43, 58]. В течение многих лет ее широко использовали для разделения различных материалов, главным образом сложных смесей природных соединений. Методом проявительной хроматографии можно проводить разделение от миллиграммовых до гектограммовых количеств веществ при мягком режиме и использовании несложного лабораторного оборудования. В последние двадцать лет быстро развились и получили широкое распространение другие хроматографические методы, так что значение адсорбционной хроматографии одно время существенно уменьшилось, однако в последнее время интерес к ней вновь повысился, в первую очередь благодаря развитию теории и совершенствованию инструментального оснащения газовой хроматографии. Примерно десять лет назад были получены модифицированные адсорбенты, обеспечивающие быстрое и эффективное разделение, разработаны новые системы детекторов для обнаружения веществ в элюате, а также аппаратура для автоматической регистрации хода процесса разделения (как и в ГЖХ)*.

В итоге была разработана хроматография высокого давления, которая в настоящее время представляет собой наиболее прогрессивный метод разделения. Этим методом достигается эффективное разделение микрограммовых количеств смесей соединений при разрешающей способности в 3—20 раз выше разрешающей способности тонкослойной хроматографии (ТСХ), а

* Общепринятые сокращенные обозначения типов хроматографии см. в табл. 1.2.

производительность колонок сравнима с производительностью насадочных колонок для ГЖХ. Для разделения требуется всего несколько минут, и полученные количественные характеристики разделения отлично воспроизводятся. Таким образом, хроматография высокого давления, несомненно, наиболее эффективный метод аналитической химии. Поскольку из всех известных соединений примерно 85% нелетучи или термически нестойки, сразу становится очевидно, насколько широкой может быть область применения этой наиболее современной разновидности адсорбционной хроматографии. Обычная адсорбционная хроматография все еще сохраняет свое значение в форме гравитационной разновидности благодаря простоте техники эксперимента в большой производительности (о применении этого метода см. в [19, 90]).

4.2. АДСОРБЕНТЫ

4.2.1. ОБЩИЕ СВОЙСТВА АДСОРБЕНТОВ

Разделение соединений методом адсорбционной хроматографии (см. гл. 1 и 2) в принципе возможно из-за различия в равновесном распределении компонентов смеси между неподвижной фазой (адсорбентом) и подвижной жидкой фазой (т. е. элюирующей системой), не смешивающихся между собой.

Характер и прочность адсорбции существенно зависят от природы адсорбента, химического состава адсорбируемого вещества и подвижной фазы.

Вещества, применяемые в качестве адсорбентов, должны удовлетворять нескольким основным требованиям. Так, они не должны растворяться в хроматографических растворителях, должны быть химически инертны по отношению к элюирующим системам и хроматографируемым соединениям и должны обла-

Таблица 4.1

Основные адсорбенты классической ЖХ

Адсорбент	Размер частиц, мм	Удельная поверхность, $м^2/г$	Средний размер пор, нм
Силикагель	0,04—0,5	400—600	3—10
Оксид алюминия	0,04—0,21	70—200	6—15
Синтетический силикат магния	0,07—0,25	300	—
Активный древесный уголь	0,04—0,05	300—100	2—4
Полиамид	0,07—0,16		

дать высокой адсорбционной способностью, обратимость адсорбции при этом должна сохраняться. Процесс установления равновесия, определяемый молекулярной диффузией, должен происходить возможно быстрее, и при этом течение жидкой фазы через колонку должно быть однородным. Кроме того, основные требования предусматривают возможность быстрого изготовления хроматографических колонок и воспроизводимость результатов. Чаще всего применяемые адсорбенты (табл. 4.1) имеют пористую структуру. В зависимости от того, используют ли их в обычной гравитационной хроматографии или в современной жидкостной хроматографии высокого давления (ЖХВД)*, они характеризуются различными размерами и структурой зерен.

Структура пор, размеры и форма частиц — это основные факторы, определяющие свойства хроматографических систем. Размеры частиц часто указываются в традиционной, но устаревшей номенклатуре; в табл. 4.2 эти размеры переведены в метрическую систему. Пористая структура частиц адсорбента, применяемых в обычной ЖТХ, такова, что помимо маленьких пор, расположенных на поверхности частиц, имеются еще глубокие поры, заходящие внутрь частицы. Эти поры заполнены слоем жидкой фазы, через который растворенное вещество вносится внутрь адсорбента. Диффузия внутрь этих пор протекает относительно медленно, в результате образуются широкие зоны, заполненные адсорбированным веществом. Этот нежелательный эффект еще более усиливается из-за неправильной формы частиц, имеющих зачастую различные размеры, так что приготовить такую колонку, по всей длине которой адсорбция происходила бы одинаково, часто очень сложно. Именно по этой причине и задерживалось развитие колоночной адсорбционной хроматографии, преимущества которой (большая производительность, простота хроматографирования) были известны уже в течение нескольких десятилетий.

Несколько лет назад были найдены способы преодоления большинства этих недостатков. В частности, были разработаны новые типы адсорбентов с высокой разделяющей способностью.

С появлением поверхностно-пористых адсорбентов со сферической формой частиц глубину пор удалось уменьшить и, таким образом, существенно ускорить массоперенос. Эти частицы состоят из непористого ядра, обычно стеклянного, диаметром

* В литературе употребляются и другие названия этого типа хроматографии, например высокоэффективная, высокопроизводительная или высокоскоростная жидкостная хроматография, или современная жидкостная хроматография. Международное обозначение HPLC относится к следующим двум названиям: жидкостная хроматография высокого давления и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).

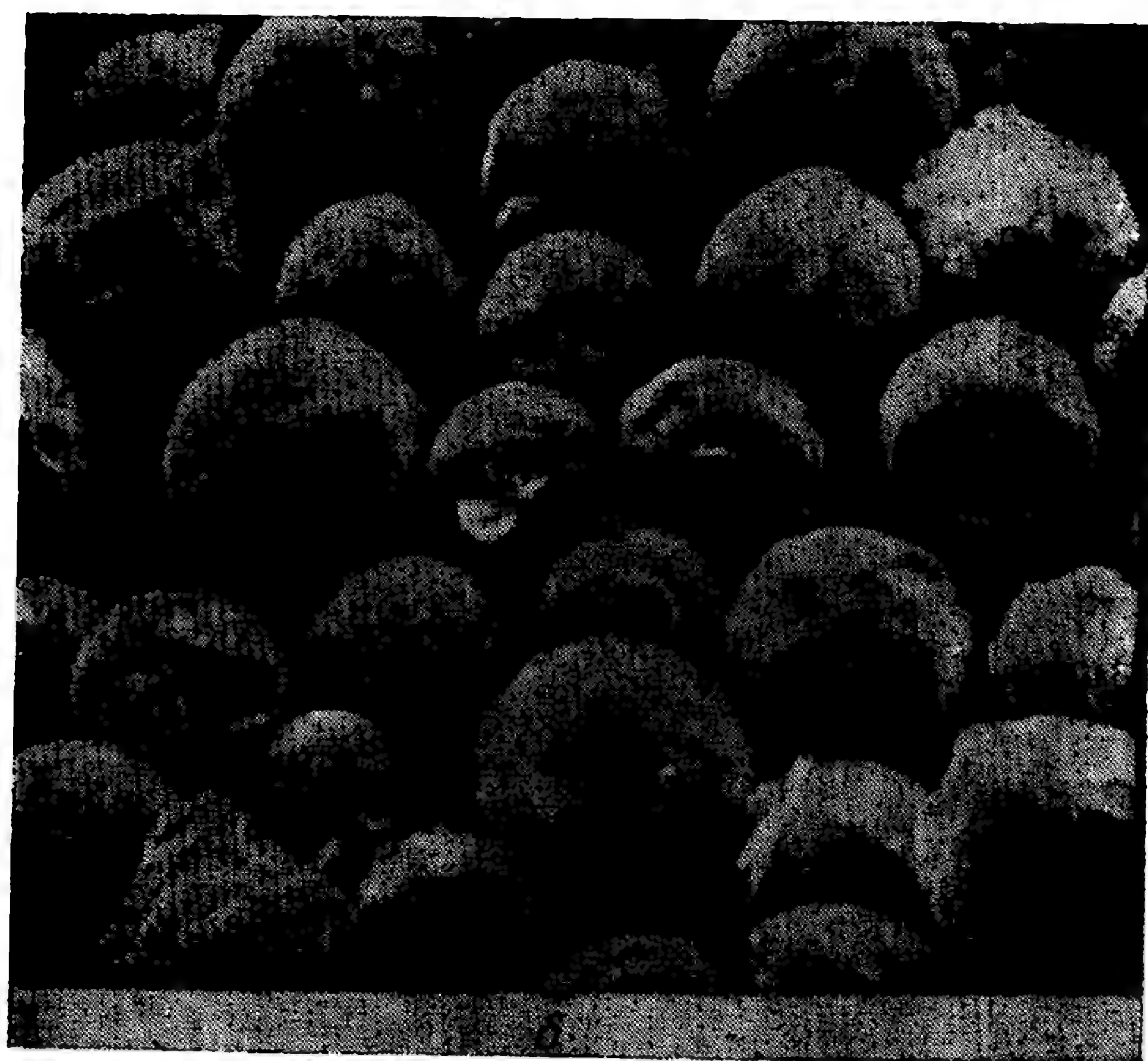
Таблица 4.2

Размеры частиц, определяемые ситовым анализом по стандартам ряда стран, и их метрический эквивалент

Стандарт США ASTM E 11-66, номер сита и число меш	Британский стандарт BS 410 1962, число меш/дюйм	Стандарт ФРГ, серия сит DIN 4188, мм	Японский стандарт JISZ 8801, номер сита	Метрический эквивалент, мм
400	—	—	—	0,037
325	350	0,045	325	0,044
—	—	0,050	—	—
270	300	—	280	0,053
—	—	0,056	—	—
230	240	0,063	250	0,063
200	200	—	200	0,074
—	—	0,080	—	—
170	170	0,090	170	0,088
140	150	0,100	145	0,105
120	120	0,125	120	0,125
100	100	—	100	0,149
—	—	0,160	—	0,160
80	85	—	80	0,177
—	—	0,200	—	—
70	72	—	65	0,210
60	60	0,250	55	0,250
50	52	—	48	0,297
—	—	0,315	—	—
45	44	—	42	0,354
—	—	0,400	—	—
40	36	—	36	0,420
35	30	0,500	32	0,500
30	25	—	28	0,595
—	—	0,630	—	—
25	22	—	24	0,707
—	—	0,800	—	—
20	18	—	20	0,841
18	16	1,000	16	1,000
16	14	—	14	1,190
—	—	1,250	—	—
14	12	—	12	1,410
12	10	1,600	10,5	1,680
10	8	2,000	9,2	2,000



а



б

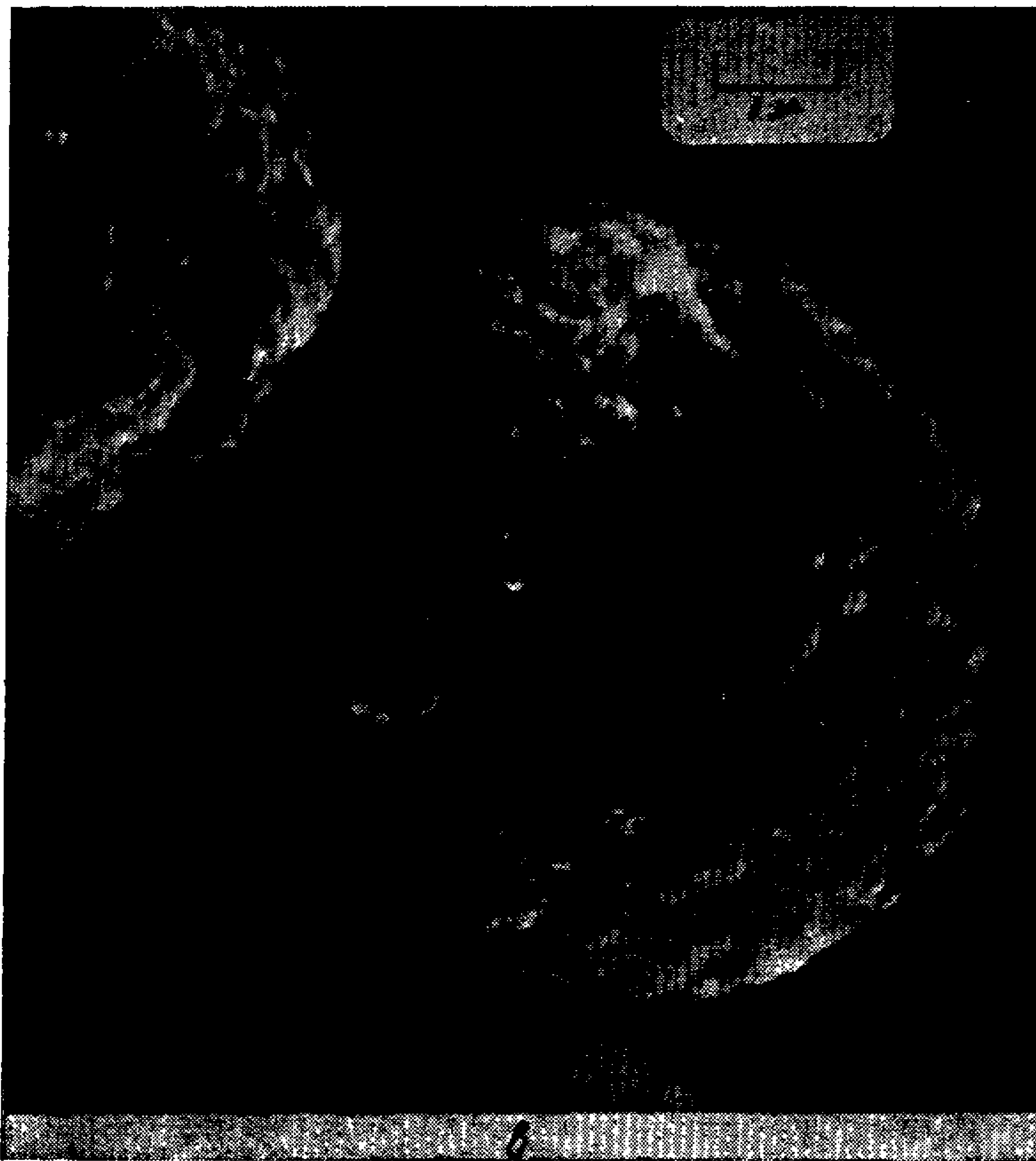


Рис. 4.1. Электронные микрофотографии полностью пористых (*а*, *в*) и поверхностно-пористых (пелликулярных) (*б*) адсорбентов.

а — Sil-X; *б* — перисорб-А; *в* — пористая сферическая микрочастица силикагеля производства фирмы E. I. Du Pont de Nemours and Co. (Рис. 4.1, *а* и *б* опубликованы с разрешения д-ра Р. Э. Мейджорса и редактора International Laboratory, рис. 4.1, *в* — с разрешения Дж. Дж. Киркленда и редактора J. Chromatogr. Sci.)

около 30 мкм, покрытого пористым слоем собственно адсорбента (силикагеля, оксида алюминия) толщиной 1—2 мкм. Они называются шариками с пористым слоем (ШПС). Поскольку сферические ядра частиц могут быть достаточно однородны по размерам, методика приготовления однородных слоев значительно улучшилась и сильно возросла эффективность разделения, однако в результате этого одновременно существенно уменьшился коэффициент емкости колонок (до 20 раз по сравнению с обычными адсорбентами). Этот недостаток удалось преодолеть после того, как были получены также сферические цели-

ком пористые частицы очень маленьких размеров (5—10 мкм). Форма и размеры частиц адсорбента показаны на рис. 4.1. Чтобы обеспечить течение жидкой фазы через колонки, заполненные такими мелкогранулированными адсорбентами [45], необходима специальная аппаратура, позволяющая проводить хроматографирование при высоком давлении. В результате был разработан новый метод — высокоскоростной эффективной жидкостной хроматографии. Применяя частицы диаметром 5—10 мкм, удается получить оптимальное соотношение между производительностью колонки и давлением, при котором еще возможно однородное заполнение колонок.

Помимо пор, важную роль играют обладающие максимальной энергией адсорбции центры поверхности адсорбента, на которых преимущественно адсорбируются молекулы хроматографируемых веществ. Иногда адсорбционная связь настолько сильна, что способна вызвать изомеризацию адсорбируемых молекул. На интенсивность адсорбции и ориентацию адсорбированных молекул влияет взаимное геометрическое расположение адсорбента и адсорбированных молекул. Каждый тип адсорбента характеризуется своим особенным геометрическим расположением центров адсорбции, и соответственно по этой причине один тип адсорбента более пригоден для разделения данной группы соединений, чем другой (так, например, разделение полициклических углеводородов на оксиде алюминия идет лучше, чем на силикагеле).

Насыщая адсорбционные центры модератором (дезактиватором) [46], можно приготовить адсорбент, поверхность которого однородна по адсорбционным свойствам. В простейшем варианте это делают, добавляя известное количество воды к адсорбенту, обладающему максимальной адсорбционной активностью (последний готовят посредством высушивания). Этот метод используется также для получения адсорбентов со стандартной активностью (см. ниже об активации и стандартизации отдельных адсорбентов). Свойства поверхностей адсорбентов можно значительно изменить, применяя химически связанные неподвижные фазы, которые улучшают избирательность хроматографического разделения [27] (см. разд. 4.2.9). Например, в результате реакции гидроксильных групп с триметилхлорсиланом получают совершенно неполярную поверхность силикагеля.

По своей физико-химической природе адсорбенты делятся на две большие группы — полярные и неполярные. К первым относятся все оксиды и соли. При адсорбции на адсорбентах этого типа наиболее важную роль играют ион-дипольные и диполь-дипольные взаимодействия. На неполярных адсорбентах, например активном древесном угле или силикагеле с химически связанным неполярным компонентом, адсорбция возможна глав-

Таблица 4.3

Функциональные группы органических веществ, расположенные в порядке возрастания адсорбируемости [65]

⟶

$-CH_2-$, $-CH_3$, $-CH=$, $-S-R$, $-O-R$, $-NO_2$, $-NH$ (карбазол), $-COOR$, $-CHO$, $-COR$, $-OH$, $-NH_2$, $-COOH$

ным образом благодаря дисперсионным (вандерваальсовым) взаимодействиям между адсорбентом и недиссоциированными молекулами. При адсорбции на полярных адсорбентах решающее значение имеют число и характер полярных функциональных групп в молекуле адсорбированного вещества. В табл. 4.3 функциональные группы расположены в порядке возрастания адсорбируемости (определенной на силикагеле) тех соединений, в состав которых входят эти группы [65]; такое распределение носит очень приближенный характер, поскольку существует еще различие между алифатическими и ароматическими соединениями. Далее, оказывают влияние величины дипольного момента и поляризуемости молекул. Влияние двойных или тройных связей на адсорбционные свойства ничтожно мало по сравнению с влиянием числа упомянутых функциональных групп. Влияние данной функциональной группы соединения на его адсорбируемость различно для разных адсорбентов. Среди других факторов, в большей или меньшей степени влияющих на адсорбируемость, следует упомянуть pH адсорбента, стерические факторы и полярность элюирующей системы. На адсорбцию на неполярных адсорбентах влияют главным образом размеры молекул (они возрастают с возрастанием молекулярной массы, достигая определенного максимума, а затем убывают) и стерические факторы.

Разработан специальный тип адсорбционной хроматографии — так называемая хроматография на серебросодержащих сорбентах (адсорбентах, предварительно пропитанных раствором нитрата серебра, или на катионообменниках в Ag^+-форме). В принципе в этом виде хроматографии используется быстрое и обратимое взаимодействие ионов серебра и ненасыщенных соединений, приводящее к образованию π-комплексов [85]. Поэтому хроматографию на серебросодержащих сорбентах можно с успехом применять для разделения различных ненасыщенных соединений, например углеводородов [50], липидов [48], включая разделение *цис-транс*-изомеров.

Теоретические принципы адсорбционной хроматографии рассматриваются в обзоре [70].

4.2.2. СИЛИКАГЕЛЬ

В настоящее время силикагель (кремнезем, кремневая кислота, кизельгель) — наиболее распространенный полярный адсорбент; особенно часто его применяют в дезактивированной форме. Основные преимущества силикагеля — это относительная инертность, большая адсорбционная емкость; силикагель легко поддается модификации: различные типы его значительно

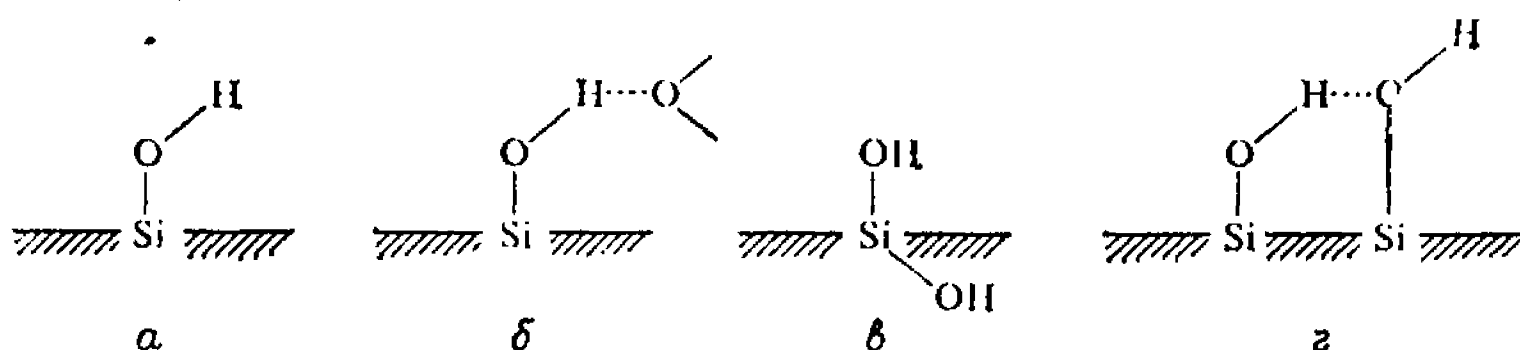


Рис. 4.2. Различные типы OH-групп на поверхности силикагеля [69а].
а — свободная гидроксильная группа; *б* — связанная гидроксильная группа; *в* — геминальная гидроксильная группа; *г* — реакционноспособная гидроксильная группа.

различаются по размерам пор и суммарной удельной поверхности, измеренным в стандартных условиях. Поверхность силикагеля также можно модифицировать или покрыть пропитывающей средой. Силикагель $SiO_2 \cdot xH_2O$ имеет аморфную структуру. Элементарная ячейка его тетраэдрическая (SiO_4). Пористость частиц силикагеля зависит от способа его изготовления. Его получают из золей кремневой кислоты поликонденсацией ортокремневой кислоты. Элементарные частицы силикагеля, сохраняющие мицеллярную структуру исходной кислоты, содержат внутри силоксановые связи Si—O—Si. Вследствие того что каждая элементарная частица соприкасается с поверхностями нескольких соседних частиц, образуются конгломераты, пронизанные капиллярами различного диаметра (3—30 нм). Внутренняя поверхность силикагеля энергетически неоднородна из-за наличия нескольких типов беспорядочно распределенных OH-групп. Возможное расположение этих групп показано схематически на рис. 4.2. Кроме OH-групп, наиболее важную роль в адсорбционных процессах играют поверхностные силоксановые группы. Они могут образоваться в результате конденсации реакционноспособных или геминальных OH-групп в процессе активации силикагеля при повышенных (200—400 °C) температурах. Присутствующая в силикагеле вода удерживается в нем либо благодаря капиллярной конденсации, либо в результате взаимодействия с поверхностными гидроксильными группами.

Размер пор представляет собой важную характеристику данного типа адсорбента. Для гравитационного варианта адсорбционной хроматографии большинства соединений наиболее при-

годен силикагель с диаметром пор около 6 нм. Исключение составляют неполярные соединения, в частности углеводороды; их разделять удобнее на узкопористом силикагеле с порами диаметром около 3 нм. Он характеризуется удельной поверхностью 500—650 м²/г, имеет нерегулярное строение, аморфен и неоднороден, а гидроксильные группы представлены главным образом реакционноспособными и водородосвязанными группами. У так называемых крупнопористых силикагелей средний размер пор составляет около 15 нм, а удельная поверхность меньше 400 м²/г. Структура их поверхности полукристаллическая, однородная; гидроксильные группы находятся на ней преимущественно в свободном виде.

В настоящее время известно более 100 сортов силикагеля [31], свойства которых могут сильно различаться. Некоторые марки силикагеля предназначаются специально для разделения определенных групп соединений, например липидов, или для специальных методов хроматографии, например «сухой колоночной хроматографии» [8]. Товарный силикагель обязательно должен быть химически чистым. Ионогенные примеси, которые могут остаться в материале в процессе приготовления, способны вызывать изомеризацию хроматографируемых соединений или каким-либо иным образом нарушать процесс хроматографического разделения. Помимо ионогенных примесей, качество адсорбента снижают также следы органических соединений, особенно если этот адсорбент используют для выделения из многокомпонентных смесей следов соединений, которые затем анализируют масс-спектрометрически. Размеры частиц различных марок силикагеля лежат в пределах от 0,063 до 0,5 мм, плотность его составляет 0,3—0,5 г/см³.

Силикагель пригоден для выделения из смесей большинства соединений и для разделения сложных смесей на группы, однако из-за слабой кислотности его поверхности (pH 3—5) на нем нельзя проводить разделение соединений с сильными основными свойствами, которые взаимодействуют с ним химически. Силикагель непригоден также для разделения химически очень близких веществ, различающихся главным образом положением двойных связей в молекуле. Однако, если пропитать силикагель раствором нитрата серебра (см. ниже), то в результате получится адсорбент с высокой разрешающей способностью в отношении ненасыщенных соединений, обусловленной образованием комплексов этих веществ с катионом серебра [42].

В библиографии по жидкостной хроматографии [19] рассматриваются возможные области применения силикагеля для разделения многих типов соединений, а в обзорных статьях [31, 47] обсуждаются методы приготовления, свойства и характеристики силикагеля.

В большинстве случаев, особенно при использовании рутинных методов анализа, стараются работать со стандартизованными адсорбентами. В настоящее время известно, что применяемый силикагель должен всегда изготовляться одним и тем же способом, иметь одни и те же характеристики пор (размеры, распределение по размерам и одни и те же группы атомов на стенках пор), а также одну и ту же активность [31].

Хотя фирмы выпускают силикагель возможно более узких фракций, все же товарный силикагель необходимо еще раз поделить на фракции посредством просеивания или седиментации, а затем, если необходимо, промыть разбавленным раствором гидроксида натрия, органическими растворителями, например хлороформом, метанолом, и водой и после этого высушить. Чтобы получить адсорбент с заданной активностью, надо добавить к сухому адсорбенту отмеренное количество дистиллированной воды. Можно проводить дезактивацию, добавляя такие спирты, как пропанол, этиленгликоль, глицерин, но чаще всего дезактивируют силикагель водой. Активность этого адсорбента обычно определяют с помощью азокрасителей [33]; методика определения подробно описана в разд. 4.2.3. Соотношение между количеством введенной воды и полученной активностью адсорбента показано в табл. 4.4. В большинстве случаев для хроматографирования пригоден адсорбент, содержащий 10—12% воды. Если же содержание воды превышает 16%, то разделение идет по механизму, характерному для распределительной хроматографии (ЖЖХ). Далее мы обсудим способы приготовления силикагеля, его разделения на фракции, дезактивации, регенерации, а также пропитки нитратом серебра.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ МАКРОПОРИСТОГО СИЛИКАГЕЛЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ КАТИОНООБМЕННИКА [54]

Сухой катионообменник (вофатит KPS 200 или подобный ему материал в количестве 2 кг, размер частиц 0,3—1 мм) обычным способом переводят в H^+-форму и тщательно промывают водой. Колонку, заполненную катионообменником, можно использовать 20—25 раз. Жидкое стекло (1 л) разбавляют примерно четырьмя объемами воды, чтобы в итоге получить раствор с плотностью около 1,070. К каждому литру полученного разбавленного раствора добавляют 35 мл 25%-ного аммиака. Если после введения аммиака отделяются примеси, их надо удалить, например посредством декантации. Затем раствор фильтруют через колонку с катионообменником в H^+-форме со скоростью 1—3 объема колонки в час. Как только из колонки начинает поступать золь кремневой кислоты, pH выходящего потока падает до 2,5—3. С этого момента начинают собирать золь и со-

бирают его до тех пор, пока величина pH не начнет возрастать, что означает прорыв катионов. За положением фронта обмена удобно следить по нагретой зоне, которую легко обнаружить на ощупь. Перед окончанием процесса полезно уменьшить скорость течения. Полученный золь должен содержать не более нескольких десятых процента ионов натрия и аммония и не более 0,1% сульфатных и хлоридных анионов, если было взято жидкое стекло хорошего качества. Колонку с ионообменником промывают до нейтральной реакции, регенерируют 5%-ной соляной кислотой и опять промывают до нейтральной реакции.

Полученный золь устойчив, но лучше все же сразу провести его дальнейшую обработку. Для этого золь помещают в стеклянный сосуд со скоростной мешалкой и при температуре не выше 20 °C и интенсивном перемешивании добавляют 10%-ный (масса/объем) раствор бикарбоната аммония в таком количестве, чтобы его объем равнялся одной сотой объема золя. За 5—7 мин содержимое сосуда застудневает. Образуется настолько плотный гель, что он затрудняет движение мешалки. Однако в процессе приготовления геля его необходимо все время перемешивать, и мотор мешалки можно выключить только в момент застудневания. Если приготовлено большое количество золя, раствор бикарбоната аммония следует охладить до 2—5 °C; в этом случае гель образуется за 70—80 с. Полученный гель оставляют на 24 ч, чтобы он созрел; за это время отделяется небольшое количество воды. Гель разбивают на комки размером около 1—2 см и сушат при 120 °C в хорошо вентилируемом сушильном шкафу, уложив там его частицы тонкими слоями. Гель высыхает за 36—48 ч, образуя маленькие стекловидные комочки. Полученный сухой силикагель размалывают в электрической кофемолке или в шаровой мельнице и фракционируют просеиванием или седиментацией.

ДЕЛЕНИЕ АДСОРБЕНТА НА ФРАКЦИИ ПО РАЗМЕРАМ ЧАСТИЦ

Ниже описывается несколько упрощенная методика Питры и Штербы [55].

Для фракционирования 2 кг исходного силикагеля, предназначенного для колоночной хроматографии, необходимы пять 10-литровых широкогорлых бутылей. Силикагель помещают в первую бутыль, которую затем заполняют водой до уровня 30 см, и тщательно перемешивают содержимое. После минутного отстаивания отделяют суспензию от осадка, сливая ее во вторую бутыль, и доливают воду в обе бутыли до уровня 30 см. Содержимое второй бутыли перемешивают и после двухминутного отстаивания декантируют суспензию в третью бутыль. Содержимое первой бутыли перемешивают и декантируют суспензию во

вторую бутыль. В обе бутыли доливают воду, как раньше, и продолжают процесс дальше. Продолжительность оседания частиц в каждой последующей бутыли должна быть вдвое больше, чем в предыдущей, т. е. соответственно 1, 2, 4, 8 и 16 мин. Когда все бутыли заполнены, то, как и раньше, в систему вводят пять порций воды. Если дистиллированной воды не хватает, сначала можно использовать водопроводную воду и только последние две промывки проводить дистиллированной водой. Продолжительность осаждения в каждой бутыли та же, что и раньше. Фракции из бутылей фильтруют с отсасыванием и сушат 12 ч при 120 °С. Полученные таким образом фракции силикагеля имеют следующие размеры частиц: >100 мкм (*1*), 80—200 мкм (*2*), 70—140 мкм (*3*), 50—90 мкм (*4*) и 35—60 мкм (*5*).

Фракции *1* и *2* обычно размалывают повторно и вновь фракционируют. Фракции *3*—*5* дезактивируют. С этой целью в склянку с притертой пробкой вводят требуемое количество воды (например, 12%), равномерно смачивают этой водой стенки склянки, после чего добавляют определенную навеску силикагеля. Смесь тщательно взбалтывают или непрерывно перемешивают не менее 2 ч (до установления равновесия).

ПРИГОТОВЛЕНИЕ СИЛИКАГЕЛЯ, ПРОПИТАННОГО НИТРАТОМ СЕРЕБРА

Нитрат серебра (45 г) растворяют в 350 мл дистиллированной воды и смешивают этот раствор с 300 г силикагеля. Суспензию упаривают в роторном испарителе при пониженном давлении (от водоструйного насоса), чтобы испарение было равномерным. Далее адсорбент сушат не менее 12 ч под вакуумом до постоянной массы в колбе (при температуре бани 130 °С) или в сушильном шкафу (130 °С). Согласно другой методике [1], суспензию выпаривают в роторном испарителе при 70 °С в течение 12 ч и активируют, нагревая 6 ч при 80 °С в вакууме (0,13 мм рт. ст.), а затем 8 ч выдерживают в сушильном шкафу при 120 °С.

Чтобы избежать полного почернения адсорбента, при хроматографировании надо покрыть алюминиевой фольгой колонки с силикагелем, пропитанным нитратом серебра. Рекомендуется также очищать растворители от следов серусодержащих соединений, лучше всего предварительно фильтруя их через небольшое количество адсорбента.

После разделения слабополярных соединений можно регенерировать адсорбент, промывая колонку предварительно очищенным от пероксидов безводным эфиром (очистка проводится посредством фильтрации через щелочной оксид алюминия с актив-

ностью I; на 25 г адсорбента берут 250 мл эфира). Эфир вытесняют из колонки петролейным эфиром, после чего колонка готова к употреблению.

РЕГЕНЕРАЦИЯ СИЛИКАГЕЛЯ

Силикагель кипятят 30 мин в колбе с обратным холодильником с 5—10-кратным количеством 1%-ного водного раствора гидроксида натрия, после чего проверяют суспензию фенолфталеином на щелочную реакцию. Если реакция щелочная, горячую суспензию фильтруют, трижды промывают дистиллированной водой и вновь кипятят 30 мин в колбе с обратным холодильником с 3—6-кратным количеством 5%-ной уксусной кислоты. После фильтрации его промывают последовательно дистиллированной водой до нейтральной реакции, метанолом и еще два раза дистиллированной водой и активируют, нагревая 12 ч в сушильном шкафу при 120 °С.

4.2.3. ОКСИД АЛЮМИНИЯ

После силикагеля оксид алюминия является наиболее часто употребляемым адсорбентом. Он характеризуется высокой адсорбционной способностью, и его легко обрабатывать. Выпускаются три вида оксида алюминия: щелочной, нейтральный и кислый, и при правильном применении и соответствующей степени активности оксида алюминия на нем можно успешно разделять большинство соединений. Как и силикагель, оксид алюминия можно пропитать раствором нитрата серебра.

Известно более 12 кристаллических модификаций оксида алюминия. Большинство из них пригодно для хроматографии. Оксид алюминия получают частичной дегидратацией (прокаливанием при 200—600 °С) гидроксидов, получаемых, например, при обработке раствора алюмината натрия диоксидов углерода. В товарном оксиде алюминия преобладает γ-форма, в кристаллической решетке которой каждый атом алюминия окружен шестью атомами кислорода, а каждый атом кислорода — тремя атомами алюминия и атомом водорода, образующим внутримолекулярную водородную связь. В оксиде алюминия имеется система правильных цилиндрических микропор диаметром 2,7 нм и беспорядочно расположенные микропоры большего диаметра. Товарные продукты различаются главным образом по степени гидратации поверхности и по типу дефектов кристаллической структуры. Краткое описание поверхностных дефектов дано Снайдером [70]. Бóльшая часть содержащейся воды образует поверхностные гидроксильные группы или находится в адсорбированном состоянии. После прокаливания при 300 °С бóльшая

часть воды удаляется, одновременно оставшиеся молекулы воды реагируют с поверхностью, в результате чего образуются ОН-группы. Спектроскопически различают пять типов гидроксильных групп, три из которых присутствуют даже при повышенной температуре. Однако для собственно адсорбции важны три следующих типа поверхностных центров: 1) кислотные с положительным зарядом, 2) основные, или протоноакцепторные, и 3) электроноакцепторные (переносчики заряда). Соединения, адсорбирующиеся на центрах с положительным зарядом, наиболее многочисленны. Размеры частиц товарных марок оксида алюминия лежат в пределах 0,004—0,2 мм, удельная поверхность — от 70—200 $м^2/г$, размеры пор — 6—15 нм, удельная масса — около 0,9 г/мл.

Оксид алюминия пригоден для разделения не слишком полярных стереоизомеров или соединений с различными функциональными группами, особенно способных образовывать внутримолекулярные водородные связи. Наличие двойных углерод-углеродных связей приводит к увеличению адсорбции, причем на оксиде алюминия этот эффект заметнее, чем на силикагеле. Разделение ароматических углеводородов с различным числом углеродных атомов в молекуле и различными стерическими характеристиками на оксиде алюминия также более эффективно, чем на силикагеле.

Основная форма оксида алюминия (*щелочной оксид алюминия*) дает водный экстракт с pH 9,5—10,5 в зависимости от условий получения. Если при изготовлении оксида алюминия его недостаточно тщательно отмыли от примеси карбоната натрия, то при прокаливании местами образуется алюминат натрия, который при повышенной температуре гидролизуется водой, вследствие чего получается экстракт со щелочной реакцией. Щелочной оксид алюминия пригоден для разделения ненасыщенных и ароматических углеводородов, стероидов, алкалоидов, синтетических красителей и других соединений, устойчивых в щелочной среде. В продажу обычно поступают определенные фракции оксида алюминия; пригодные для хроматографии фракции можно получить седиментацией (см. выше получение фракций силикагеля; причем длительность седиментации оксида алюминия вдвое меньше). Активность товарных образцов различна. Чтобы получить максимальную активность (активность I), слой оксида алюминия толщиной 3—5 см прокаливают 6—8 ч при 350 °С, периодически помешивая. Затем дают адсорбенту немного (в течение 5 мин) остыть и помещают небольшое его количество в бутыль для хранения, которую равномерно обогревают, вращая ее вместе с адсорбентом, после чего всыпают в эту бутыль оставшуюся часть еще горячего адсорбента. Бутыль плотно закупоривают резиновой пробкой. Разработан и другой

Таблица 4.4

Зависимость активности оксида алюминия, силикагеля и силиката магния от количества добавленной воды

Активность[a]	Содержание воды, %		
	оксид алюминия	силикагель	силикат магния
I	0	0	0
II	3	5	7
III	6	15	15
IV	10	25	25
V	15	38	35

[a] Степень активности определяется по Брокману и Шоддеру [11]. Указано среднее содержание воды, зависящее также от типа адсорбента и метода его приготовления. Воду добавляют к полученному после прокаливания наиболее активному виду адсорбента, активность которого принимают за I.

способ активации оксида алюминия: его прокаливают 2—3 ч при 120 °С в колбе, помещенной в масляную баню, под вакуумом (от масляного насоса). Чтобы получить оксид алюминия с меньшей активностью, к наиболее активному адсорбенту добавляют соответствующее количество дистиллированной воды (см. табл. 4.4).

Активность адсорбентов определяют с помощью азокрасителей, применяя метод Брокмана и Шоддера [11] или ТСХ [32].

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ОКСИДА АЛЮМИНИЯ МЕТОДОМ ТСХ

Около 10 г оксида алюминия наносят на стеклянную пластинку (размером, например, 10×20 см) и разравнивают его стеклянной палочкой, концы которой утолщают, наматывая клейкую ленту до 0,6 мм по толщине. Намотанные слои ленты должны отстоять друг от друга примерно на 4 см и иметь приблизительно такую же ширину. На пластинку наносят на расстоянии 3 см от края 0,02 мл раствора азокрасителя. Растворы красителей готовят, растворяя в порциях по 50 мл сухого перегнанного тетрахлорметана соответственно 30 мг азобензола (т. кип. 68 °С, перекристаллизован из этанола), 20 мг *п*-метоксиазобензола (т. пл. 55 °С, перекристаллизован из водного метанола), 20 мг суданового желтого (т. пл. 34 °С, перекристаллизован из метанола), 20 мг суданового красного III (т. пл. 84 °С, перекристаллизован из этилацетата) и 20 мг *п*-аминоазобензола (т. пл. 27 °С, перекристаллизован из петролейного эфира). Пластинку элюируют в слегка наклонном положении в неглубокой

Таблица 4.5

Значения R_f[a] отдельных азокрасителей, полученные на образцах оксида алюминия с различной активностью

Азокраситель	Степень активности оксида алюминия по Брокману и Шоддеру [11]			
	II	III	IV	V
Азобензол	0,59	0,74	0,85	0,95
п-Метоксиазобензол	0,16	0,49	0,65	0,89
Судановый желтый	0,01	0,25	0,57	0,78
Судановый красный III	0,00	0,10	0,33	0,56
п-Аминоазобензол	0,00	0,03	0,08	0,19

[a] Погрешность определения R_f ±0,04.

камере, в которую добавляют тетрахлорметан. Значения R_f отдельных азокрасителей, измеренные по центрам пятен, меняются, как следует из данных табл. 4.5, в соответствии с активностью адсорбента по Брокману и Шоддеру [11].

Нейтральный оксид алюминия применяется чаще всего (pH его водного экстракта от 6,9 до 7,1 в зависимости от источника получения). На дезактивированном адсорбенте можно разделить менее устойчивые соединения, например альдегиды, кетоны, хиноны, гликозиды, а также соединения, неустойчивые в щелочных средах, например сложные эфиры, лактоны. Кроме того, он пригоден для разделения слабых органических кислот и оснований. Нейтральный оксид алюминия обычно готовят из щелочного оксида алюминия, тщательно промывая последний водой [50] или обрабатывая этилацетатом [20]. Однако большинство товарных марок нейтрального адсорбента получают, удаляя щелочи разбавленными кислотами (соляной, уксусной). В лабораторных условиях нейтральный оксид алюминия можно получить следующим образом. Навеску оксида алюминия кипятят 30 мин в колбе с обратным холодильником при перемешивании с 3—5-кратным объемом воды. Далее раствор декантируют, а остаток вновь кипятят с водой, пока pH водного экстракта не станет равным 7,5. После этого оксид алюминия фильтруют с отсасыванием, смешивают с избытком этилацетата и оставляют отстаиваться на несколько суток. После чего вновь фильтруют с отсасыванием, промывают метанолом, потом несколько раз водой и активируют, как описано выше. Разделительную способность оксида алюминия в отношении непредельных соединений, например углеводородов, можно еще более усилить, пропитывая его нитратом серебра.

ПРОПИТКА ОКСИДА АЛЮМИНИЯ НИТРАТОМ СЕРЕБРА

Нитрат серебра (25 г) растворяют в 380 мл дистиллированной воды и добавляют этот раствор при перемешивании к 500 г нейтрального оксида алюминия. Полученную суспензию упаривают досуха в роторном испарителе при температуре бани 110—130 °С и немного пониженном давлении (водоструйный насос). В указанных условиях вода отгоняется равномерно. Когда смесь высохнет, ее 15 мин активируют при температуре бани 130 °С в полном вакууме. При использовании полученного таким образом адсорбента следует учитывать возможность изомеризации, особенно при работе с кислородсодержащими соединениями (см. разд. 4.2.10).

Кислый оксид алюминия обычно получают, промывая щелочной или нейтральной оксид алюминия кислотами (соляной, уксусной); pH его водного экстракта около 4. На кислом оксиде алюминия хроматографируют некоторые природные и синтетические красители, аминокислоты, ароматические и алифатические карбоновые кислоты. В спиртовой или водной среде он действует как ионообменник.

4.2.4. СИЛИКАТ МАГНИЯ ФЛОРИЗИЛ

Синтетический силикат магния поступает в продажу под названием «флоризил» (Floridin Co., Pittsburgh, Pa.) или «магнезол» (Westvaco Chlorine Products Corp., S. Charleston, W. Virginia). По своим хроматографическим свойствам этот дезактивированный адсорбент (см. табл. 4.4) занимает промежуточное положение между оксидом алюминия и силикагелем. Его с успехом применяют для разделения некоторых стероидов, которые легко элюируются с оксида алюминия, а также липидов, гликозидов и некоторых производных сахаров. Опубликован обзор свойств этого адсорбента [66]. Чтобы получить нейтральный адсорбент, силикат магния промывают последовательно разбавленной соляной кислотой, уксусной кислотой и тщательно метанолом и дистиллированной водой.

4.2.5. ОКСИД МАГНИЯ

Хроматографические свойства оксида магния целиком зависят от способа его приготовления. Бомхоф [9] обнаружил, что оксид магния с наилучшими хроматографическими свойствами можно получить, прокаливая гидроксид магния 12 ч при 400 °С. При большей продолжительности и более высокой температуре прокаливания площадь активной поверхности адсорбента уменьшается главным образом вследствие спекания. Мак-

симальная удельная поверхность хорошо приготовленного оксида магния составляет около 190 м²/г. Товарные образцы оксида магния значительно различаются по адсорбционным свойствам; иногда заметны различия даже между разными партиями, выпущенными одной фирмой.

Оксид магния чаще всего применяется для разделения соединений типа каротиноидов и порфиринов. Хроматографические свойства оксида алюминия наиболее подробно исследовал Снайдер [68]. Этот автор нашел, что активность дезактивированного водой оксида магния можно быстро повысить, элюируя его сухими органическими растворителями. Однако после такой обработки возможна необратимая адсорбция некоторых органических, главным образом ароматических, соединений. Этого нежелательного явления можно избежать, используя растворители, содержащие воду. По своим свойствам оксид магния в известной степени похож на оксид алюминия. Основное различие заключается в его большем сродстве к двойным углерод-углеродным связям, а следовательно, и к ароматическим соединениям. Для хроматографического анализа можно использовать собственно оксид магния и различные его комбинации с другими адсорбентами. В колоночной хроматографии обычно применяют оксид магния в сочетании с диатомовой землей, чтобы облегчить элюирование. Николаидес [51] определил условия тонкослойного и колоночного хроматографирования таких смесей восков и стеринов, которые трудно разделить другими методами. Он показал, что разделение веществ на оксиде магния происходит в соответствии с плоскостными размерами их молекул.

4.2.6. ДРЕВЕСНЫЙ УГОЛЬ

Древесный уголь — это типичный представитель адсорбентов с развитой внутренней поверхностью. Адсорбция на древесном угле возможна благодаря дисперсионным силам (см. разд. 4.2.1). Он характеризуется малой избирательностью в отношении различных типов веществ, а относительная эффективность адсорбции на нем определяется молекулярными размерами. Хроматографические свойства древесного угля в значительной степени зависят от исходного материала, способа получения и имеющихся примесей. Эта зависимость значительно сильнее, чем у других адсорбентов.

Известны три основных вида древесного угля. *1*) Графитированный древесный уголь; его получают при температуре выше 1000 °С. В принципе это чистый углерод с отчетливо неполярной поверхностью. *2*) Активный древесный уголь — продукт низкотемпературного окисления органических веществ. Он содержит значительное количество кислорода и водорода в виде поляр-

ных функциональных групп. Используемые при его получении соли нелегко удалить. Этот адсорбент характеризуется беспорядочным распределением пор. *3*) Углеродистые молекулярные сита; их получают посредством термической деструкции полимеров типа сарана.

Поступающие в продажу марки древесного угля, предназначенного для хроматографических целей, обычно представляют собой смеси первых двух типов. Очень часто они настолько мелкодисперсны, что их приходится использовать в смеси с целитом или целлюлозой (1 : 1), чтобы скорость элюирования была приемлемой. Некоторые товарные марки следует очищать, например кипячением с 20%-ной уксусной кислотой или раствором цианида калия [60]. Раньше древесный уголь широко применяли; например, он оказался пригодным для хроматографирования соединений с высокой реакционной способностью, сахаридов и смесей ароматических и алифатических соединений. Свойства древесного угля описаны в статье [39].

4.2.7. ПОЛИАМИДЫ

Наряду с классическими неорганическими адсорбентами в последнее время в качестве адсорбентов в органической химии и биохимии применяются различные полимеры. Для хроматографического разделения низкомолекулярных соединений чаще всего используются адсорбенты типа полиамидов. Благодаря их способности разделять даже сильнополярные вещества при элюировании такими растворителями, как вода и водные растворы низших спиртов, полиамиды существенно дополнили набор адсорбентов, применяемых в органической химии.

Имеется несколько теорий, посредством которых пытаются объяснить механизм хроматографического разделения на полиамидах. Авторы одной из таких теорий считают, что основную роль в данном случае играет образование водородных связей между протонодонорными группами хроматографируемого вещества и карбонильным кислородом амидных групп в полиамидной цепи. При этом избирательное элюирование адсорбированных веществ происходит в результате разрыва водородных связей вследствие конкурирующего влияния элюентов [23, 24, 34]. Эту концепцию можно в первую очередь применить к хроматографии соединений, содержащих протонодонорные группы, например гидроксильные, аминные и иминные, сульфоновые, карбоксильные, пероксикарбоксильные и группы, содержащие пятивалентный фосфор. В число веществ, хорошо разделяемых на полиамидах, входят соединения с электрофильными функциональными группами, например хиноны, нитросоединения, нитрилы и альдегиды. По отношению к этим соединениям амид-

ные группы уже не являются сорбционными центрами; вместо них эту роль выполняют концевые аминогруппы полиамидных молекул [22, 29]. Однако позднее были получены экспериментальные данные, не укладывающиеся в эту теорию, и постепенно начала завоевывать признание другая концепция, согласно которой хроматография на полиамиде в действительности представляет собой простую или обращенно-фазную распределительную хроматографию, где в зависимости от состава применяемого растворителя поверхность полиамида может выполнять функцию полярной или неполярной фазы [13, 16, 17, 21, 35, 81, 89].

Вопрос о механизме разделения на полиамидах все еще остается открытым. Барк и Грэхем [4—7] разработали новую теорию механизма этих процессов и подтвердили справедливость ее обширным экспериментальным материалом. Согласно этой теории, хроматографирование на полиамидах идет в две стадии. Первая стадия — это адсорбция фенольных групп на полиамиде в результате образования водородной связи с поверхностной группой —CO—NH—, а вторая стадия — это десорбция фенольных групп при взаимодействии с подвижной фазой. Основным фактором, определяющим величину R_f соединения, является сольватация гидрофильной или гидрофобной части молекулы. В неводных элюирующих системах сольватируется гидрофобная часть, а в водных системах происходит сольватация фенольного гидроксила.

Следует отметить, что на хроматографическое разделение на полиамидах влияют не только протонодонорные и нуклеофильные группы, но и ароматические ядра, двойные связи, сопряжение двойных связей, азогруппы и т. п., т. е. фрагменты с делокализованными π-электронными системами. Их наличие в молекуле хроматографируемого вещества увеличивает его сорбционное сродство к полиамиду.

Исходя из изложенного, хроматографическое разделение на полиамиде можно рассматривать как процесс одновременного электронодонорного и электроноакцепторного взаимодействия, на который оказывают влияние и химическая природа хроматографируемых соединений, и состав элюирующих систем, а также структура поверхности и качество адсорбента.

В настоящее время выпускается несколько марок полиамида, предназначенных для колоночной и для тонкослойной хроматографии; в табл. 4.6 приведены наиболее распространенные модификации. Эти продукты значительно различаются по свойствам. Качество полиамидных сорбентов существенно зависит не только от состава мономерного звена, но и от молекулярной массы, наличия низкомолекулярных компонентов и способа приготовления. Сорбционные свойства полиамида зависят также от

Таблица 4.6

Готовые полиамидные сорбенты для колоночной хроматографии

Товарная марка	Размер частиц, мкм	Химический состав	Фирма-изготовитель
SC-66	<70	Найлон 6,6 (полигексаметилендиаминадипинат)	Macherey, Nagel and Co, D-516 Düren (ФРГ)
SC-6	<70	Перлон (поликапролактам)	То же
SC-6	<160	»	»
SC-6-Ac	<160	Ацетилированный перлон	»
Woelm	Не указан	Поликапролактам	Woelm, 344 Eschwege (ФРГ)

степени ориентации макромолекул. Для хроматографических целей пригодны только полиамиды с большим содержанием неориентированных цепей, т. е. цепей со свободными группами NH— и O—C.

С целью характеристики сорбционной способности применяемых в колоночной хроматографии полиамидных порошков Леман и др. [44] разработали колориметрический метод, основанный на определении адсорбированного красителя — β-нафтолового оранжевого (Orange II).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОРБЦИОННОЙ АКТИВНОСТИ ПОЛИАМИДНОГО ПОРОШКА

1. *Получение β-нафтолового оранжевого, определение степени его чистоты и приготовление раствора.* Краситель β-нафтоловый оранжевый можно получить в результате реакции β-нафтола и диазониевой соли сульфаниловой кислоты [26]. Можно также использовать готовый продукт, имеющийся в продаже. Чистоту этого красителя определяют методом ТСХ на целлюлозе (MN 300 UV, Macherey-Nagel), применяя в качестве элюирующего растворителя органическую фазу смеси *н*-бутанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 5). Краситель (400 мг) растворяют в 500 мл дистиллированной воды, 3 мл этого раствора, что соответствует 2,4 мг β-нафтолового оранжевого, разбавляют 50 мл дистиллированной воды и определяют коэффициент поглощения. При длине волны 485 нм он равен 2,3.

2. *Приготовление проб полиамида.* Пробы порошкообразного полиамида (по ~1 г), сорбционную способность которого надо определить, оставляют в воде на 2 ч. Набухший полиамид

отфильтровывают и промывают 100—200 мл дистиллированной воды, чтобы удалить низкомолекулярные компоненты и пыль. Промытый порошок сушат 24 ч при 70 °С в сушильном шкафу и для каждого определения взвешивают по три навески по 100 мг.

3. *Определение сорбционной емкости.* Каждую пробу полиамида смешивают в маленькой колбочке с 3 мл раствора красителя и оставляют на 2 ч для завершения реакции, периодически встряхивая. Далее смесь переносят в специальную микрохроматографическую колонку, откуда раствор с неадсорбированным красителем стекает в стандартную 50-миллилитровую колбу. Колонку промывают дистиллированной водой (10—20 мл), пока не перестанет вытекать краситель. Колбу заполняют до метки и определяют фотометрически количество неадсорбированного красителя, сравнивая его с контрольным холостым раствором. Чтобы определить количество красителя, адсорбированного на полиамиде, элюируют колонку примерно 10 мл метанольного раствора гидроксида натрия (1 г гидроксида натрия на литр 70%-ного метанола). Элюат собирают в колбу емкостью 50 мл, содержащую 0,5 мл разбавленной уксусной кислоты (1 часть ледяной уксусной кислоты+1 часть 70%-ного метанола), и разбавляют водой до метки. При длине волны 485 нм измеряют коэффициент поглощения относительно контрольного холостого раствора, приготовленного таким же способом. По коэффициентам поглощения адсорбированного и неадсорбированного красителей определяют сорбционную емкость полиамида — количество микромолей красителя, адсорбированного одним граммом полиамидного порошка (молекулярная масса β-нафтолового оранжевого равна 350,0). Сумма масс адсорбированного и неадсорбированного красителя должна равняться исходной массе красителя.

Интересно, что сорбционную емкость полиамида можно значительно повысить, если растворить его в концентрированной кислоте (соляной, уксусной и т. п.) и осадить затем водным метанолом [44].

ОДИН ИЗ СПОСОБОВ ПОЛУЧЕНИЯ ДЕШЕВОГО АДСОРБЕНТА С НУЖНЫМ РАЗМЕРОМ ЧАСТИЦ [77]

Для приготовления хроматографического полиамида можно использовать какой-либо легко доступный полимерный материал (например, ультрамид B3, выпускаемый фирмой BASF, Людвигсхафен, ФРГ). Навеску полиамида (225 г) сначала суспендируют в 1,5 л ледяной уксусной кислоты (98—99%), а затем растворяют в ней, осторожно нагревая в колбе с обратным холодильником. Раствор оставляют до следующего дня, при этом из него выпадает густой пастообразный осадок, который

отфильтровывают при сильном отсасывании. Твердый остаток дважды тщательно размешивают с 5 л дистиллированной воды и вновь фильтруют. Промытый полиамид суспендируют в 3 л дистиллированной воды, добавляют к ней разбавленный раствор аммиака до pH 7,5—8,0 и оставляют на 12 ч. После этого еще раз регулируют pH, если это необходимо, и полученный продукт отфильтровывают с отсасыванием, дважды промывают 5 л дистиллированной воды и в заключение 50%-ным метанолом. Сушат полиамид на воздухе в виде тонкого слоя до тех пор, пока среднее содержание воды в нем составит около 35%*. Полученный влажный полиамид продавливают пластмассовым шпателем через шелковое сито размером 22 меш. Полученным гранулам дают подсохнуть, чтобы содержание воды снизилось до 15%, затем продавливают через сито размером 44 меш* и окончательно сушат в сушильном шкафу при 60 °C. Полученный порошок адсорбента фракционируют на вибрационных ситах. Около 36% всего количества — это фракция частиц размером 0,1—0,2 мм, около 38% — фракция частиц размером 0,2—0,3 мм и около 19% составляют частицы менее 0,1 мм. Общий выход фракции частиц размером 0,1—0,3 мм составляет около 74% перекристаллизованного продукта.

Хроматографии на полиамиде посвящено много хороших обзорных статей, приведем хотя бы две последние [75, 82]. Полиамид чаще всего применяется при разделении фенольных соединений — простых промежуточных продуктов синтеза или природных соединений, например лигнанов и различных продуктов деструкции лигнина, затем флавоноидов, многоатомных спиртов, кислот, аминокислот, пептидов, азотсодержащих гетероциклических соединений, некоторых алкалоидов, стероидов, желчных кислот, антибиотиков, синтетических красителей, инсектицидов и гербицидов, кумаринов, соединений иридия и т. д. Для хроматографии хинонов и их производных, а также ароматических соединений, нитро- и полинитросоединений используют ацетилированные полиамиды.

4.2.8. ПОЛИСТИРОЛЬНЫЕ АДСОРБЕНТЫ

Амберлит XAD представляет собой синтетический неполярный адсорбент, получаемый сополимеризацией стирола с дивинилбензолом (изготовитель фирма Rohm and Haas Co., Philadelphia, Pa., США). Наиболее широко используется амберлит

* Содержание воды определяют высушиванием при 105 °C до постоянной массы.

* Используются так называемые мельничные сита с различным размером ячеек (число меш на дюйм). Подбирая соответствующие сита, можно приготовить адсорбент с другими размерами частиц.

марки XAD-2, обладающий очень выгодными свойствами (уд. поверхность 300 $м^2/г$, размер пор около 9 нм). Хотя у этого материала высокая пористость, растворенные вещества очень слабо проникают внутрь его микросфер, и адсорбция происходит в основном на их поверхности. Адсорбция на амберлите возможна вследствие вандерваальсовых взаимодействий между гидрофобной частью молекулы и неполярной матрицей. Причем адсорбция тем сильнее, чем выше полярность растворителя, поэтому растворенные вещества очень хорошо адсорбируются из водной среды и еще лучше из растворов электролитов. Так, этот адсорбент успешно используется для концентрирования и выделения веществ — носителей запаха свежего мяса [88], удаления избытка пикриновой кислоты, применяемой при извлечении белков из клеточных экстрактов [87], разделения нитро- и хлорфенолов [30]. Применение амберлита ХАД-2 с частицами соответствующих размеров для разделения различных оснований методом ЖХВД описано в статье [15].

Адсорбционное равновесие существенно зависит от числа и природы полярных и неполярных групп в хроматографируемом веществе. Например, из водного раствора фенол адсорбируется полностью, а фенолят натрия не адсорбируется. Явно неполярные вещества, например каротиноиды или холестерин и другие стероиды, хорошо адсорбируются из раствора в метаноле, и их можно извлечь из колонки, только элюируя смесью метанола и дихлорметана.

В Европе фирма Serva (Гейдельберг, ФРГ) выпускает амберлит XAD в виде широкой фракции с частицами размером 0,3—1 мм в виде более узких фракций уже промытого адсорбента (под названием сервахром-XAD-2). Выпускаются фракции с частицами размером 50—100 мкм, 125—150 мкм, 150—200 мкм, 100 — 200 мкм и 200—250 мкм. Амберлит XAD-2 (размер частиц 0,3—1 мм) непригоден для непосредственного употребления, его сначала необходимо размолоть, затем поделить на фракции и промыть. Размолоть этот амберлит довольно легко, так как крупные частицы представляют собой агломераты большого числа микроскопических шариков.

ПОДГОТОВКА АМБЕРЛИТА ХАД-2 (0,3—1 ММ)

Амберлит-XAD суспендируют в небольшом количестве воды, тонко размалывают в ступке, сушат на воздухе и рассеивают на необходимые фракции. Отдельные фракции промывают в течение нескольких суток метанолом в аппарате Сокслета. Очищенные фракции сушат сначала на воздухе, а затем в вакууме при 60 °С. Приготовленный таким образом адсорбент хранят в хорошо закупоренных склянках.

4.2.9. АДСОРБЕНТЫ ДЛЯ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ВЫСОКОГО ДАВЛЕНИЯ (ЖХВД)

В разд. 4.2.1 уже говорилось, что адсорбенты, применяемые в ЖХВД, отличаются от адсорбентов, предназначенных для обычной хроматографии, структурой, а также размером и формой частиц. Адсорбенты для ЖХВД можно разделить на две большие группы: поверхностно-пористые и полностью пористые. Поверхностно-пористые адсорбенты получают следующим образом: на твердые, непористые, сферические ядра наносят пористый слой собственно адсорбента толщиной 1—2 мкм (см. разд. 4.2.1 и рис. 4.1, *б*). Благодаря такому строению все типы этих адсорбентов-носителей — шарики с регулируемой поверхностной пористостью, шарики, покрытые пористыми слоями, шарики, покрытые пленкой,— достаточно прочны и не разрушаются при высоких давлениях, применяемых при хроматографическом разделении. Хотя глубина адсорбционного слоя у таких адсорбентов значительно уменьшена, в адсорбентах типа корасил (табл. 4.7) имеется довольно много очень маленьких пор, что значительно расширяет адсорбционную зону, а производительность колонки сильно зависит от скорости течения. Ввиду относительно малой величины адсорбционной поверхности (1—15 м^2/г) в такие колонки нельзя вводить пробы большого объема, так как перегрузка колонки приводит к снижению ее разделительной способности. Средняя емкость колонки — порядка 0,1 мг пробы на 1 г адсорбента. Малая емкость является недостатком, если используются малочувствительные детекторы, например рефрактометр. Однако сильнополярные вещества, вероятно, лучше разделяются на адсорбентах этого типа, потому что их легче можно элюировать. Кроме того, колонки с такими адсорбентами легче приготовить, подвижная фаза легче проникает в эти адсорбенты, в результате повышается средняя скорость течения (но одновременно снижается высота, эквивалентная теоретической тарелке, ВЭТТ). На этих адсорбентах можно как и на адсорбентах других типов, закреплять жидкие фазы и использовать их также для жидко-жидкостной хроматографии. В табл. 4.7 дан список некоторых адсорбентов вместе с их характеристиками.

Адсорбенты типа полностью пористых были в числе первых применены в ЖХВД. Вначале это были используемые в обычной ЖТХ фракционированные пористые материалы с частицами неправильной формы диаметром менее 74 мкм (рис. 4.1). Преимущества адсорбентов этого типа — их доступность, низкая стоимость и бóльшая по сравнению с поверхностно-пористыми адсорбентами адсорбционная поверхность (в среднем 100—300 м^2/г, см. табл. 4.7). Соответственно ими можно плот-

Таблица 4.7

Адсорбенты для ЖХВД[а]

Тип адсорбентов	Товарная марка	Размер (мкм) и форма частиц[б]	Удельная поверхность, м²/г	Фирма[в]
Поверхностно-пористые				
Химически связанная фаза	Карбовакс 400/корасил[г]	37—50, сф.	7	WA
	C_{18}/корасил[д]	37—50, сф.		WA
	ODS/корасил[е]	37—50, сф.	7	WA
	Фенил/корасил[ж]	37—50, сф.		WA
	Видак, полярная связанная фаза[з]	30—44, сф.		AS
	Видак, обращенная фаза[и]	30—44, сф.		AS
Оксид алюминия	Полумина HS, HC	37—44, сф.	HS-4, HC-8	RA
Полиамид	Пеллидон[к]	45	1	RA
Силикагель	Корасил I, II[л]	37—50, сф.	I-7, II-14	WA
	Пелосил HS, HC	37—44, сф.	HS-4, HC-8	RA
	Перисорб A[м]	30—40, сф.	10	EM
	Видак 101 SI	30—44, сф.	12	AS
	Зипакс	37—44, сф.	1	PN
Полностью пористые				
Химически связанная фаза	Карбовакс 400/порасил C[н]	36—75, сф.		WA
	н-Октан/порасил C[н]	75—125, сф.		WA
	OPN/порасил C[н]	36—75, сф,	50	WA
Оксид алюминия	Оксид алюминия био-рад AG[о]	74, н.	200	BR
	Меркосорб алокс T[п]	5—30, н.	70—90	EM

	Сферисорб А	5, 10, 20, сф.	95	PS
	Оксид алюминия воельм[о]	18—30, н.	200	W
Полиамид	Полиамид-6-HPLC	20—32, н.		MN
Разные адсорбенты	Амберлит XAD-2[р]	н.	300	RN
	Ацетилцеллюлоза MN 300	50—60, н.		MN
	Порагель[с]	37—75, н.		WA
Силикагель	Биосил А[т]	20—44, н.	200	BR
	Меркосорб SI 60	5—40, н.	200	EM
	Порасил[у]	37—75, сф.	2—500	WA
	Сил-Х	36—45, сф.	300	PE
	Сферисорб S	5, 10, 20, н.	200	PS
	Зорбакс-сил	6—8, сф.	250—350	PN

[а] Подробный обзор материалов для заполнения колонок и выпускаемых готовыми к употреблению колонок опубликован Мейджорсом [46а]. [б] сф. — сферическая форма, н. — неправильная форма. [в] Список фирм: AS — Applied Science Laboratories, Inc., State College, Pennsylvania 16801; BR — Bio-Rad Laboratories, Richmond, California 94804; EM — E. Merck, D-61, Darmstadt; MN — Macherey-Nagel, D-516, Düren; PE — Perkin-Elmer Corp., Norwalk, Connecticut 06852; PN — E. I. Du Pont de Nemours and Co., Inc., Wilmington, Delaware 19898; PS — Phase Separations Ltd., Queensferry, UK; RA — H. Reeve Angel Scientific Ltd., London; RH — Rohm and Hass Co., Philadelphia, Pennsylvania; WA — Waters Associates, Inc., Milford, Mass. 01757; W — M. Woeim, D-344 Eschwege. [г] Мономолекулярный слой полиэтиленгликоля; неустойчив при контакте с водой и метанолом. [д] Мономолекулярный слой октадецилтрихлорсилана, устойчив к гидролизу; товарная марка бондапак. [е] Мономолекулярный слой октадецилсилана. [ж] Мономолекулярный слой дифенилдихлорсилана. [з] Мономолекулярный слой нитрила. [и] Мономолекулярный слой октадецилсилана. [к] Слой найлона на стеклянной сердцевине. [л] II содержит двойной слой адсорбента. [м] Для регенерации нельзя применять растворитель более полярный, чем метанол. [н] Товарная марка этой группы — дурапак. [о] Выпускается в щелочной, нейтральной и кислотной формах. [п] Щелочной; pH 10%-ной водной суспензии равен 9. [р] Сополимер стирола с дивинилбензолом; выпускается в виде порошка с зернами размером 20—60 меш; подлежит размолу. [с] Сшитый полистирольный гель с различными поверхностными группами (OH, CO). [т] Выпускается со следующими средними размерами зерен: 5, 10, 20, 30 и 40 мкм. [у] Выпускается несколько разновидностей с различными размерами зерен: A, B, C, D, E, F; химически дезактивирован; не следует использовать с растворителями более полярными, чем метанол.

нее заполнять колонки, что создает преимущества как при определении следовых количеств, так и при препаративных разделениях (1 мг пробы на 1 г адсорбента), особенно при использовании малочувствительных детекторов. Чтобы получить адсорбенты, однородные по адсорбционной способности, целесообразно дезактивировать их, добавляя 0,02—0,04 г воды в расчете на 100 м^2 поверхности. Некоторые фирмы выпускают адсорбенты в виде узких фракций с частицами размером от 5 до 40 мкм и с различным диаметром пор. Однако заполнение колонок тонкодисперсными адсорбентами проводится по особой методике, поэтому некоторые адсорбенты поставляются фирмами в виде заполненных готовых к употреблению колонок. По сравнению с колонками с поверхностно-пористыми адсорбентами в данном случае допустимы бо́льшие скорости течения, эффективность колонки при этом не снижается. Однако уменьшение размеров частиц приводит к увеличению гидравлического сопротивления колонки; при размере частиц 5 мкм оно в 4 раза больше, чем при размере частиц 10 мкм. Чтобы набивка колонок была более равномерной и, следовательно, воспроизводимость результатов была бы лучше, изготовлены полностью пористые сферические частицы очень маленького диаметра (5—10 мкм). Приготавливают такие частицы специальными методами, например склеиванием микрошариков из силикагеля (диаметром 5 нм) в сферические частицы практически одинакового размера [76]; свойства этих частиц значительно отличаются от свойств упомянутых выше полностью пористых частиц. При том же размере частиц достигается максимальная воспроизводимость результатов разделения и высокая эффективность колонок (ВЭТТ 0,0025—0,005 см).

На основе этих двух основных типов адсорбентов была создана специальная разновидность адсорбентов с химически связанными фазами* [38а, 57, 46]. Эти адсорбенты готовят чаще всего на основе силикагеля, поверхностные гидроксильные группы которого образуют мономолекулярный слой на поверхности частицы, взаимодействуя с соответствующими реагентами (слой типа «щетки», рис. 4.3). Обычно для их приготовления используют реакции трех типов: этерификацию, реакцию с органическими хлорсиланами и хлорирование с последующей реакцией с металлоорганическими реагентами. Химическая связь между поверхностью силикагеля и соответствующим органическим компонентом может принадлежать к одному из следующих типов: Si—O—C (например, дурапак *н*-октан/порасил C) и Si—O—Si

* Адсорбенты с химически связанными фазами рассматриваются в этом разделе по двум причинам: они применяются в ЖХВД наряду с другими адсорбентами; их готовят на основе силикагеля.

и Si—C (например, бондапак C_{18}, корасил). Связь типа сложноэфирной мало устойчива гидролитически и термически, и в качестве подвижной фазы нельзя использовать воду, кислоты, основания и низшие спирты в концентрациях, превышающих 10%. Если приготовляют полимолекулярный слой (рис. 4.3), то образуется объемная полимерная оболочка, которая действует главным образом как сорбент в жидко-жидкостной хроматографии. В других случаях мономолекулярный слой связанной фазы, вероятнее всего, действует как слабый, но избирательный адсорбент. Вопросы, связанные с механизмом разделения, до

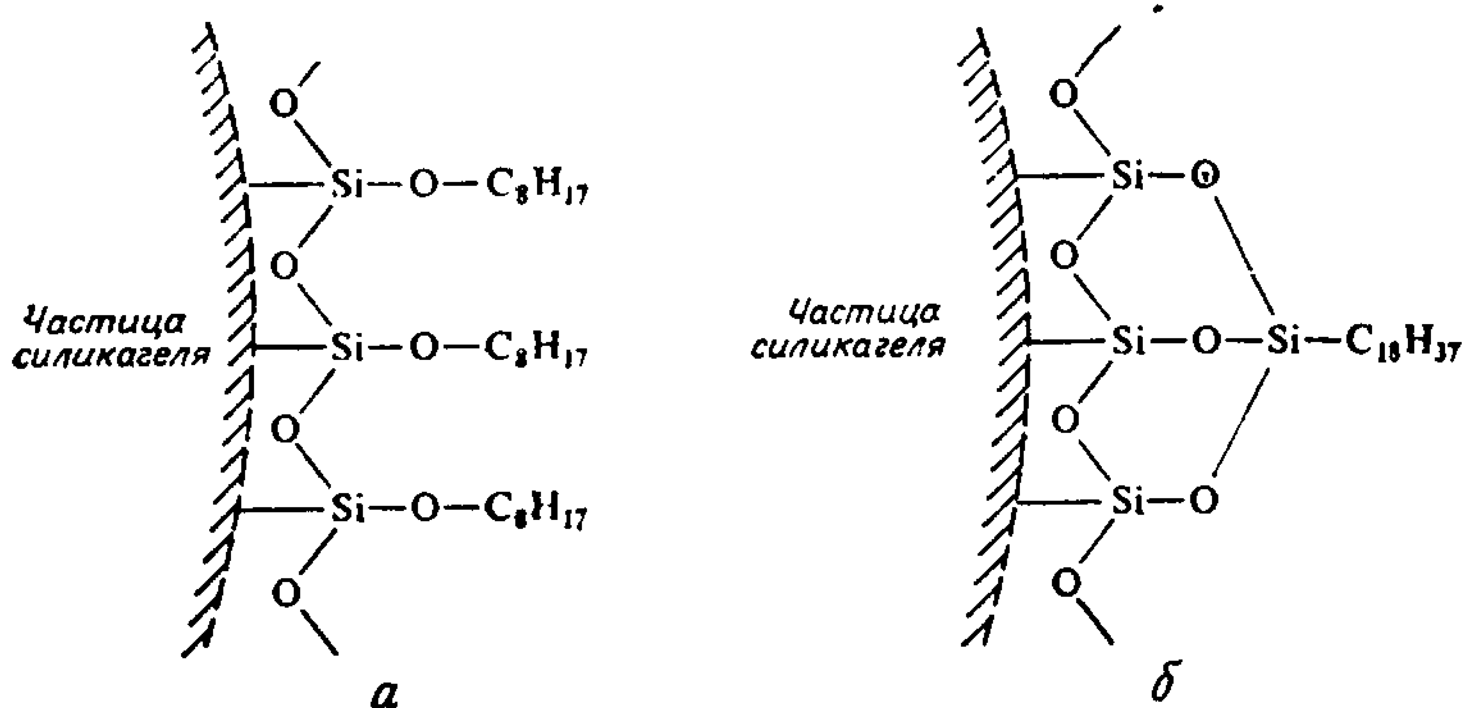


Рис. 4.3. Схематическое изображение адсорбентов с химически связанными фазами.
а — мономолекулярный слой типа «щетки»; *б* — полимолекулярный слой.

настоящего времени не получили удовлетворительное объяснение (см., например, [46]). Если увеличивается полярность концевой группы, то возрастает также степень удерживания хроматографируемого вещества. Полярность связанных фаз различна в зависимости от того, какие функциональные группы находятся в связанной органической части. Очень слабополярные фазы содержат алкилы C_{18}, C_{10}, C_8 или арилы C_6H_5. Связанный β,β'-оксидипропионитрил обладает средней полярностью; несколько менее полярен карбовакс 400, содержащий группы —(CH_2—O—CH_2) и —CH_2OH. Фазы, в которых роль ионообменников выполняют четвертичные аммониевые основания, характеризуются наивысшей полярностью.

Адсорбенты для ЖХВД чаще всего используют без дополнительной обработки в том виде, в каком они поступают в продажу. Если это необходимо, то прокаливанием можно довести их активность до максимальной; для дезактивации следует вводить не более 2% воды.

4.2.10. РЕАКЦИИ НА АДСОРБЕНТАХ

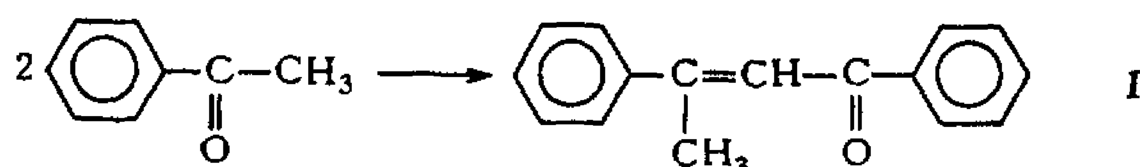
При разделении на неорганических адсорбентах, прежде всего на оксиде алюминия и силикагеле, непосредственно в хроматографической колонке могут происходить нежелательные химические превращения растворенных веществ. Это возможно или при очень высокой активности сильноосновного или сильнокислого адсорбента (оксида алюминия), или вследствие особой чувствительности веществ в определенных интервалах значений pH. Наиболее обычные реакции такого типа — изомеризация двойной связи, омыление или отщепление некоторых сложноэфирных групп, реакции альдолизации или конденсации, реакции окисления и др.

В большинстве случаев можно предотвратить эти нежелательные реакции, однако иногда их можно использовать в препаративных целях. Если при хроматографическом разделении желательно избежать каких-либо дополнительных реакций, то необходимо придерживаться определенных требований. Первое требование, выполнение которого в настоящее время уже не вызывает затруднений,— это использование действительно высококачественного адсорбента. Сейчас выпускается очень много различных адсорбентов, и вполне можно подобрать наиболее приемлемый как по поверхностным свойствам (например, имеются силикагели с различными размерами пор), так и по размерам частиц и адсорбционной способности (определяемой удельной поверхностью сорбента). Разделение соединений, содержащих сложноэфирные, кетонные и лактоновые группы, оксирановые кольца и т. п., следует проводить только на нейтральном оксиде алюминия, а отнюдь не щелочном или кислом. Последние два типа адсорбентов применяются в особых случаях. Другое важное требование — правильный выбор активности адсорбента. Адсорбенты с максимальной активностью используются редко. Третьим важным критерием является техника хроматографирования. По возможности необходимо выполнять следующие требования: 1) хроматографический процесс следует вести таким образом, чтобы все растворенные соединения контактировали с адсорбентом в течение наименьшего возможного времени; 2) колонку следует укрыть от прямого солнечного света, а если в ней находятся светочувствительные вещества, то обернуть алюминиевой фольгой; 3) при работе с термически нестойкими веществами иногда необходимо поместить колонку в охлаждаемый короб или специально приспособленный холодильник; 4) соединения, окисляющиеся на воздухе, следует хроматографировать в инертной атмосфере (например, в атмосфере азота особой чистоты); в этих случаях колонки заполняют особым образом и особым же образом обрабатывают отдельные

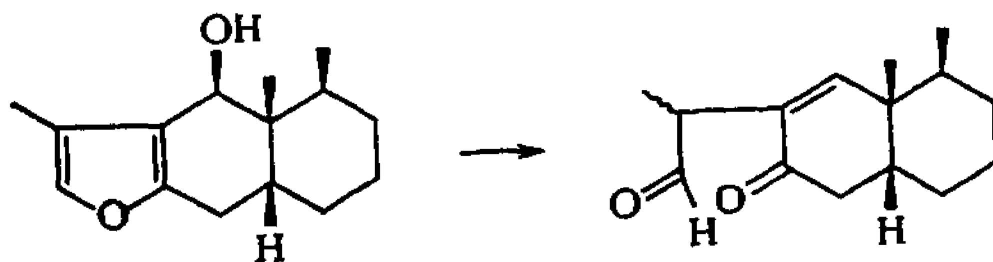
хроматографические фракции (см., например, разд. 4.5.2); 5) если нельзя выполнить требование пункта 1 и если при этом хроматографируются такие соединения, которые могут вступать в побочные реакции, то по крайней мере нельзя прерывать хроматографический процесс, т. е. его следует вести непрерывно, используя подходящие сборники фракций. В классической препаративной колоночной хроматографии соединений с очень близкими или даже почти одинаковыми величинами R_f желаемый эффект достигается за счет фактора времени, т. е. посредством очень медленного хроматографирования на взятом с большим избытком отсортированном адсорбенте с тщательно подобранной элюирующей системой. В этом случае непрерывность отбора фракций является необходимым условием успешного разделения даже при работе с вполне стойкими соединениями. Необходимость соблюдения указанного требования обусловлена тем, что если прервать элюирование, то будет идти диффузия между уже разделенными зонами. Согласно опыту автора, этим же способом можно предотвратить вторичные реакции в колонке даже при хроматографировании очень чувствительных соединений. Скорее всего это объясняется непрерывным быстрым чередованием десорбции и адсорбции хроматографируемого соединения. Если хроматографирование прерывают, этот процесс также приостанавливается и происходит более интенсивная адсорбция данного соединения, и, как следствие, изменение его структуры.

Вторичные реакции некоторых используемых как элюенты низкомолекулярных соединений при контакте с оксидом алюминия систематически изучали Зеебальд и Шунак [61—64]. Эти авторы исследовали поведение главным образом ацетона [61] и обнаружили, что он может образовать более 11 продуктов конденсации, которые были идентифицированы методами ТСХ и ГЖХ посредством сравнения с синтезированными веществами. Зеебальд и Шунак нашли, что в условиях колоночной хроматографии наблюдается прямое соответствие между активностью оксида алюминия и количеством образовавшихся продуктов конденсации. При одной и той же активности выход продуктов конденсации убывает в следующем порядке: основной оксид алюминия > нейтральный > кислый. Изучая реакции метилэтилкетона, эти авторы пришли к аналогичным выводам [62]: находясь в контакте с алюминием, он образует подобные продукты конденсации, хотя и в вдвое-втрое меньших количествах, чем ацетон. Зеебальд и Шунак исследовали также влияние оксида алюминия на пропанол и бензальдегид [63], а также ацетофенон [64]. Хотя последние два растворителя обычно не применяются в хроматографии как элюенты, появление продуктов конденсации, образовавшихся на оксиде алюминия, показывает,

насколько легко некоторые карбонильные группы могут стать причиной получения ложных результатов. При элюировании ацетофенона на количество образующихся продуктов не влияет тип используемого оксида алюминия. Однако основность адсорбента влияет на состав продуктов конденсации. Кислый оксид алюминия в большей степени благоприятствует пинакол-пинаколоновой перегруппировке и образованию 2,4-дифенилфурана. Практическим результатом этого исследования была разработка дешевого метода приготовления дипнона (I), который трудно получить другими способами [64]:



Ито и др. [37] исследовали геометрическую изомеризацию *l*- и *d*-изоментонов на поверхности кислого и основного оксида алюминия. Боне и др. [3, 10] изучали реакции некоторых стероидных метансульфонатов на оксиде алюминия. Примером использования активного силикагеля для препаративных целей является описанная Новотным и Котвой [52] реакция превращения 6β-оксифуроэреморфилана (пентасальшина). Она идет с выходом около 65%, и ее можно представить следующей схемой:



4.3. ПОДВИЖНАЯ ФАЗА

Характер подвижной фазы влияет на избирательность разделения, разделяющую способность колонки и среднюю скорость движения полос адсорбированных веществ. Назначение подвижной фазы в общих чертах описано в гл. 2.

Для хорошего разделения соединений, особенно с резко различающейся полярностью, необходима подвижная фаза с возрастающей элюирующей способностью. На элюирующую способность влияют следующие три фактора: 1) взаимодействие между молекулами подвижной фазы (растворителя) и хроматографируемого соединения, 2) взаимодействие между адсорбированными молекулами пробы и молекулами подвижной фазы, 3) взаимодействие между адсорбированными молекулами подвижной фазы и адсорбентом.

Еще в самом начале применения адсорбционной хроматографии было известно, что для полярных адсорбентов растворители неполярного характера (например, насыщенные углево-

дороды или их галогенпроизводные), как правило, представляют собой слабые элюенты и что полярные растворители (например, спирты, кислоты, основания) обнаруживают сильную элюирующую способность. Из современных представлений о роли подвижной фазы (см. обзоры Снайдера [67, 70]) следует, что более эффективны те растворители, которые сильнее адсорбируются. Мерой элюирующей способности растворителей служит параметр ε^0, численно выражающий энергию адсорбции растворителя, приходящуюся на единицу площади поверхности адсорбента стандартной активности. Определяя элюирующую способность растворителя, сравнивают его ε^0 и пентана, для которого $\varepsilon^0=0$.

В табл. 4.8 указаны наиболее распространенные и широко применяемые на практике растворители и приведены их основные физико-химические характеристики. Элюирующая способность растворителей различна для различных адсорбентов, поэтому в этой таблице даны также коэффициенты для расчета ε^0 применительно к основным видам адсорбентов. В неполярных адсорбентах определяющим фактором являются неспецифические вандерваальсовы силы; в этих случаях элюирующая способность возрастает приблизительно симбатно молекулярной массе, а порядок изменения величины элюирующих сил практически противоположен порядку их изменения для полярных адсорбентов. Таким образом, для активного угля получается следующий сокращенный элюотропный ряд (растворители перечислены в порядке возрастания элюирующей способности): вода — метанол — этанол — ацетон — пропанол — диэтиловый эфир — бутанол — этилацетат — *н*-гексан — бензол. Для полиамида получается следующий ряд: вода — метанол — ацетон — формамид — диметилформамид — водный раствор гидроксида натрия.

Общий характер соотношений между хроматографируемой пробой и элюирующей системой в зависимости от полярности представлен на рис. 4.4 как для обычного, так и для обращенного расположения фаз*.

* Обычно используют полярный адсорбент и в ходе элюирования увеличивают элюирующую способность системы, первоначально неполярной по природе. При разделении методом обращенно-фазной хроматографии применяют неполярный адсорбент [74], например древесный уголь или обработанный кремнийорганическими соединениями силикагель. Подвижной фазой служит смесь воды и водорастворимого органического растворителя; элюирующая способность смеси меняется в зависимости от соотношения этих компонентов. Такое расположение фаз годится прежде всего для разделения малополярных соединений, нерастворимых в воде, т. е. алифатических и ароматических углеводородов, галогензамещенных углеводородов и веществ, различающихся углеводородной частью молекулы, например нортестостерона и тестостерона.

Таблица 4.8

Хроматографические растворители

$\varepsilon^0(Al_2O_3)$[a]	Растворитель	Вязкость при 20 °C, сПз	Коэффициент преломления n_D	Край полосы пропускания, нм	Температура кипения, °C
—0,25	Фторалканы[б]	—	1,25	—	—
0,00	*н*-Пентан	0,23	1,358	210	36,1
0,01	Петролейный эфир	0,3	—	210	30—60
0,4	Циклогексан	1,0	1,427	210	80,7
0,05	Циклопентан	0,47	1,406	210	49,3
0,18	Тетрахлорметан	0,97	1,466	265	76,8
0,26	Амилхлорид	0,26	1,413	225	108,2
0,26	Ксилол	0,62—0,81	1,500 —	290 —	138—144 —
0,29	Толуол	0,59	1,496	285	110,8
0,30	*н*-Пропилхлорид	0,35	1,389	225	46,6
0,32	Бензол	0,65	1,501	280	80,2
0,38	Диэтиловый эфир	0,23	1,353	220	34,6
0,40	Хлороформ	0,57	1,443	245	61,3
0,42	Метиленхлорид	0,44	1,424	245	40,0
0,45	Тетрагидрофуран	0,51	1,408	220	64,7
0,49	1,2-Дихлорэтан	0,79	1,445	230	84,1
0,51	Метилэтилкетон	—	1,381	330	79,6
0,56	Ацетон	0,32	1,359	330	56,2
0,56	Диоксан	1,54	1,422	220	101,3
0,58	Этилацетат	0,54	1,370	260	77,2
0,60	Метилацетат	0,37	1,362	260	57,1
0,61	Амиловый спирт	4,1	1,410	210	137,3
0,64	Нитрометан	0,67	1,394	380	101,2
0,65	Ацетонитрил	0,65	1,344	210	81,6
0,71	Пиридин	0,71	1,510	305	115,3
0,82	*н*-Пропанол	2,3	1,385	210	97,2
0,88	Этанол	1,20	1,361	210	78,4
0,95	Метанол	0,60	1,329	210	64,6
Большой	Уксусная кислота	1,26	1,372	230	118,1
Большой	Вода	1,00	1,333	200	100,0

[a] Значения ε^0 на других адсорбентах определяются следующим образом:

$\varepsilon^0(SiO_2) = 0{,}77\varepsilon^0(Al_2O_3)$; $\varepsilon^0(\text{флоризил}) = 0{,}52\varepsilon^0(Al_2O_3)$;

$\varepsilon^0(MgO) = 0{,}58\varepsilon^0(Al_2O_3)$.

[б] Подобными свойствами характеризуются также циклические перфторэфиры (фирма Minnesota Mining and Manufacturing Co., St. Paul, Min. (США); см. [68].

Иногда наблюдаемые аномалии элюирующей способности растворителей вызваны вторичными эффектами. Они могут быть обусловлены, например, образованием водородных связей между хроматографируемым соединением и элюентом, активацией адсорбента при хроматографировании растворителями, не со-

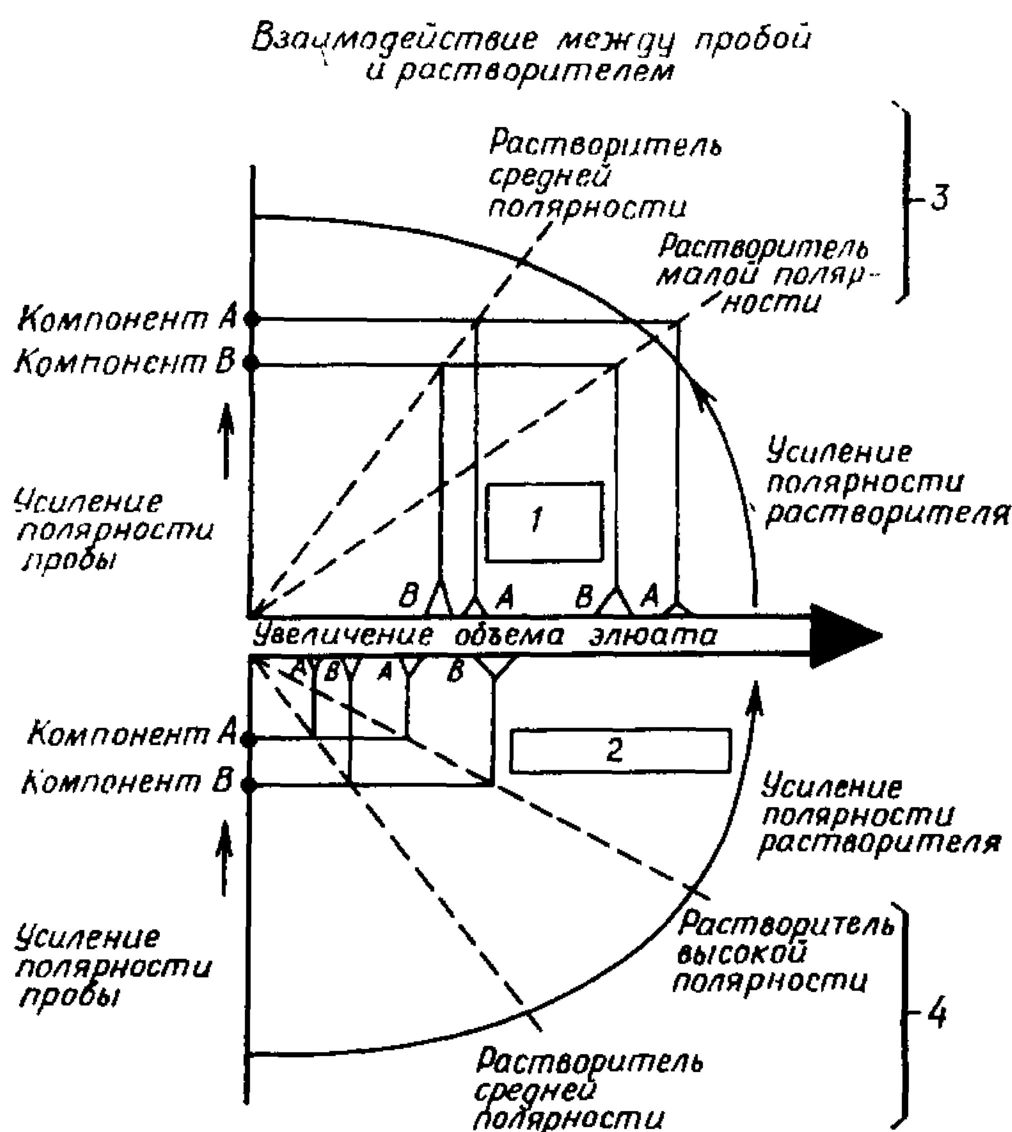


Рис. 4.4. Общие соотношения между объемом удерживания и полярностью растворителя [воспроизведено из «Developing a High-Speed Liquid Chromatography Separation» с разрешения фирмы Waters Associates Inc., Milford, Mass. (США)].

1 — нормальное расположение фаз; *2* — обращенное расположение фаз; *3* — обычно используется с сорбентами высокой полярности; *4* — обычно используется с сорбентами низкой полярности.

держащими воды, и т. п. Проявительное хроматографирование ведется путем ступенчатого элюирования с использованием подобранного по табл. 4.8 элюотропного ряда растворителей с возрастающей элюирующей способностью или подходящей смеси двух растворителей, обычно близких по величинам ε^0, если нужно более тонко воздействовать на избирательность разделения [59]. Нецелесообразно пользоваться смесями с очень малым содержанием сольнополярного компонента, потому что он будет предпочтительно адсорбироваться и произойдет разделение растворяющей смеси, приводящее к образованию второго фронта элюирующей системы. Кроме ступенчатого элюирования можно применять градиентное элюирование: постепенно увеличивать полярность растворяющей системы [69, 72]; этот метод деталь-

но описан в гл. 8. Однако следует иметь в виду, что и ступенчатое, и градиентное элюирование непосредственно не влияет на эффективность разделения пробы. Максимальная возможная степень разделения двухкомпонентной смеси приблизительно одна и та же при использовании простого, ступенчатого или градиентного элюирования. Только при разделении многокомпонентных систем применение ступенчатого или градиентного элюирования действительно обеспечивает лучшее разделение каждой пары соседних зон*.

Растворители, используемые в хроматографических целях, обычно безводны. Однако поскольку, как правило, применяются дезактивированные адсорбенты, обычно приготовляемые посредством добавления воды, то правильнее всего применять подвижные фазы, уже содержащие некоторое количество воды, достаточное для того, чтобы она не извлекалась из адсорбента, так как это привело бы к увеличению его активности. Зачастую это обстоятельство не учитывают, но если необходимо поддержать стандартные условия разделения, как, например, в ЖХВД [25], то его обязательно надо иметь в виду. С подобной проблемой сталкиваются, в частности, в тех случаях, когда в значительной степени дезактивированные адсорбенты применяются вместе с растворителями, легко смешивающимися с водой. При использовании оксида магния вода элюируется даже пентаном.

Подбор подходящей подвижной фазы в хроматографии — одна из наиболее важных и наиболее трудных задач [59]. Ее решение можно сильно облегчить, проводя предварительное разделение методом ТСХ на адсорбентах, обладающих такими же свойствами (гл. 9). В разд. 4.4.3 подробно говорится о выборе элюирующей системы.

4.4. ТЕХНИКА ХРОМАТОГРАФИРОВАНИЯ

4.4.1. ВЫБОР МЕТОДА ХРОМАТОГРАФИИ

При разделении смеси природных соединений, например растительного экстракта, или реакционной смеси выбор метода определяется главным образом типом пробы, подлежащей анализу. Разделять соединения средней молекулярной массы — от неполярных до полярных растворимых в воде соединений — лучше всего методом адсорбционной хроматографии. Для разделения высокомолекулярных соединений, например полимеров, или

* Опыт использования колоночной хроматографии для разделения наиболее сложных систем биохимического происхождения указывает на преимущества градиентного элюирования. — *Прим. ред. англ. издания.*

ионизуемых гидрофильных веществ адсорбционная хроматография в большинстве случаев непригодна.

Другой важный фактор, определяющий выбор метода,— это цель хроматографирования, а именно аналитическое или препаративное разделение, и если последнее, то какого масштаба. ЖТХ подразделяется на: а) классическую жидкостную колоночную хроматографию (классическая ЖТХ), б) тонкослойную хроматографию (ТСХ) и в) жидкостную хроматографию высокого давления (ЖХВД).

Классическая ЖТХ не потеряла своего значения, в частности, ее применяют для предварительного разделения соединений на группы, но часто даже при препаративном разделении ее заменяют на ТСХ или на ЖХВД — современный вариант ЖТХ. Все определения, которые можно выполнить и методом ЖТХ, и ТСХ, можно осуществлять и с помощью ЖХВД. Практически это означает, что начинать исследование рекомендуется с выяснения применимости ТСХ (см. гл. 9). С помощью ТСХ можно проверить применимость ЖТХ для решения данной задачи, а также легко испытать возможные варианты разделения на различных адсорбентах и в различных растворяющих системах. Таким образом, основываясь на данных, полученных методом ТСХ, можно подобрать такие условия для классической колоночной хроматографии, с помощью которых часто получаются очень хорошие результаты, хотя и за счет некоторой потери времени, или получить основные исходные данные для ЖХВД. Однако ЖХВД имеет ряд преимуществ по сравнению с ТСХ, которыми нельзя пренебречь. Это бóльшие скорость разделения и разрешающая способность, возможность более легкой автоматизации, более простая количественная оценка результатов и бóльшая пригодность для препаративных работ. Следует подчеркнуть, что в настоящее время ЖХВД быстро развивается и совершенствуется. Хотя маловероятно, чтобы классическая ЖТХ и ТСХ, обладающие рядом преимуществ и, как правило, отличающиеся исключительной простотой, были вытеснены полностью, будущее определенно принадлежит ЖХВД.

4.4.2. КОЛОНКИ И ЗАПОЛНЕНИЕ ИХ АДСОРБЕНТОМ

Первой проблемой в колоночной хроматографии является надлежащий подбор колонки. Следует уточнить тип применяемого адсорбента (силикагель, оксид алюминия и т. д.), а также размер частиц, характер поверхности (суммарная удельная поверхность, размеры пор) и, особенно если предполагается применение ЖХВД,— геометрию частиц (сферическая или неправильная форма) и их тип (полностью пористые или поверхностно-пористые). Далее необходимо определить, какое количество

воды должен содержать адсорбент, и выбрать методику заполнения им колонки.

Чаще всего хроматографисты пользуются силикагелем, его выпускают в виде самых различных модификаций, и очень часто силикагель является идеальным адсорбентом. У пористого силикагеля удельная поверхность составляет 300—800 м²/г, у пористого оксида алюминия — всего 100—200 м²/г. В то же время поверхностно-пористые адсорбенты, частицы которых состоят из внутреннего непористого ядра и тонкого пористого поверхностного слоя, например корасил I и II, характеризуются относительно малой удельной поверхностью (7—14 м²/г). Адсорбенты последнего типа нельзя сильно нагружать, и их емкость составляет только около 1/20 емкости полностью пористых адсорбентов. Размеры и геометрия частиц также влияют на эффективность колонки, т. е. на число теоретических тарелок, приходящееся на единицу ее длины. Эффективность колонки существенно возрастает с уменьшением размеров частиц. В особых случаях применяются колонки длиной 25 см, заполненные частицами диаметром 5—10 мкм, эффективность которых может достигать 10 000 теоретических тарелок. Важную роль играет также содержание воды в адсорбенте. Это справедливо не только для классической жидкостной хроматографии, где для колонок с силикагелем наилучшим является содержание воды порядка 10—15%, но и для ЖХВД. Воду добавляют с тем, чтобы увеличить интервал линейности изотермы и улучшить разделяющую способность. Рекомендуется вводить 0,04 г воды на 100 м² поверхности адсорбента.

В ЖХВД эффективность колонки пропорциональна ее длине. В гл. 2 рассматривается теоретическая трактовка эффективности колонки. Обычно в ЖХВД для аналитических целей применяются колонки следующих размеров: внутренний диаметр 1—6,4 мм, длина 25—300 см и более. У колонки для препаративной ЖХВД внутренний диаметр, как правило, больше — от 10 до 80 мм [18, 28, 86]. Некоторые фирмы выпускают готовые к употреблению заполненные колонки. Например, фирма Merck (Дармштадт, ФРГ) выпускает колонки трех размеров, заполненные силикагелем 60; размер A: 10 (внутр. диам.)×240 мм, размер B: 25 (внутр. диам)×310 мм и размер C: 37 (внутр. диам.)×440 мм.

ТЕХНИКА ЗАПОЛНЕНИЯ КОЛОНОК

а. *Обычные «классические» колонки.* В классической колоночной ЖТХ разделение обычно проводят не в аналитических, а в препаративных целях. Аналитическое разделение гораздо удобнее вести методом ТСХ, а значительно более точные резуль-

таты дает ЖХВД. Подбор колонки (диаметр и длина) определяется тем, какое количество исходного вещества надо разделить и какова цель разделения. Предварительное грубое разделение осуществляется главным образом с целью фракционирования соединений по группам. И, естественно, методика такого разделения значительно отличается от методики более тонкого разделения на отдельные соединения. В последнем случае для разделения может потребоваться несколько операций хроматографирования. Совсем другие условия выбираются, например, для препаративного выделения соединений, которые незначительно различаются по своим физико-химическим свойствам (например, имеют близкие величины R_f в ТСХ). Для предварительного разделения на группы пригодны колонки с большим внутренним диаметром; соотношение количеств адсорбента и хроматографируемой пробы должно быть мало (от 10 : 1 до 30 : 1). Для разделения такого типа успешно применяют 30—50-литровые сосуды, используемые в пилотных установках (Simax, Jena-Glass). Эти сосуды имеют вытянутую форму, они открыты сверху и оснащены выходным отверстием на стеклянном шлифе, на которое можно установить стеклянный кран. Размер частиц адсорбента в данном случае не имеет большого значения; приемлемы силикагель и оксид алюминия с относительно широким интервалом размеров частиц (0,05—0,2 мм). Необходимо только следить, чтобы в колонку не попадали очень мелкие пылевидные частицы.

Для разделения смеси соединений с относительно близкими величинами R_f подбирают более узкие и более длинные колонки, а избыток адсорбента (относительно количества вещества в разделяемой смеси) должен быть как можно бо́льшим (обычно это 100—200-кратное количество). При проведении предварительного хроматографического разделения важное значение имеют размер и форма частиц адсорбента. Так, например, окупает себя приготовление более узких фракций, одна из методик получения таких фракций описана в разд. 4.2.2.

Заполняют колонку адсорбентом разными методами. Сухим способом пользуются редко, гораздо чаще применяют следующую методику. Колонку заполняют на две трети растворителем минимальной полярности и через подходящую воронку подают в нее непрерывным потоком сухой адсорбент, одновременно через колонку пропускают элюент. Чтобы избежать образования комков при работе с очень тонкодисперсными адсорбентами, рекомендуется пропустить через воронку проволочную мешалку, приводимую в движение электромотором с регулируемым числом оборотов. Мешалка должна находиться в верхней зоне растворителя. Однако чаще всего колонки заполняют суспензией адсорбента. Через большую капельную воронку с краном с ши-

роким отверстием в колонку подают густую суспензию адсорбента в неполярном растворителе, обычно петролейном эфире. Суспензию разбавляют растворителем (двумя объемами колонки) при перемешивании. Через заполненную колонку некоторое время пропускают растворитель. Чтобы колонка заполнялась адсорбентом равномерно, во время заполнения по ней постукивают (примерно в том месте, где в этот момент оседает адсорбент) резиновой пробкой, укрепленной на палочке. Можно также периодически встряхивать колонку с помощью ручного вибратора или даже приложить давление. Таким образом достигается бо́льшая однородность заполнения колонки. Ни в коем случае нельзя допускать высыхания адсорбента в колонке. Этот метод удобен главным образом при заполнении колонок мелкими частицами силикагеля.

б. *Колонки для ЖХВД.* Поскольку для успешного разделения важно, чтобы адсорбент отвечал определенным требованиям, то, прежде чем вводить адсорбент в колонку, его тщательно обрабатывают. Прежде всего его следует полностью освободить от воды. Силикагель прокаливают 8 ч при 110 °C, оксид алюминия — также 8 ч, но при 400 °C. Адсорбенты других типов обрабатывают в соответствии с рекомендациями (см. разд. 4.2). Еще горячие адсорбенты следует перенести в предварительно приготовленные чистые тщательно высушенные стеклянные или алюминиевые сосуды подходящего размера, сразу закрыть (лучше всего резиновой пробкой) или запаять их и дать им охладиться. Далее к навеске дегидратированного адсорбента добавляют дистиллированную воду в таком количестве, которое необходимо для получения требуемой активности (способ добавления воды не имеет особого значения), и выдерживают в течение суток. Обработанным таким образом адсорбентом можно заполнять колонки. Во время заполнения необходимо следить, чтобы адсорбенты, особенно силикагель и оксид алюминия, находились в закрытых сосудах, иначе они могут очень быстро впитать влагу из воздуха и в результате еще более дезактивироваться.

В зависимости от конкретных условий методика заполнения колонок может меняться, но в принципе используют заполнение сухим адсорбентом или суспензией адсорбента в каком-либо растворителе. Сухое заполнение проводят в основном так же, как заполнение колонок для ГЖХ (см. разд. 10.3.3). Адсорбент вводят постепенно, порциями, например по 20 мг, и после добавления каждой порции сначала постукивают по колонке сбоку, а затем в течение 20—30 с осторожно постукивают дном колонки по твердой подставке или полу. Когда колонка заполнена, через нее в течение 2 ч пропускают подвижную фазу. Это очень важная операция, позволяющая удалить из колонки воз-

дух и привести адсорбент в состояние равновесия с подвижной фазой. Пористые микрочастицы диаметром меньше 20 мкм вводят в колонку в виде 15—25%-ной суспензии (см., например, обзор [71a]), чаще всего в смеси растворителей, плотность которой равна плотности адсорбента. Компонентами для таких смесей растворителей служат тетрабромэтилен, метилениодид и т. п. Приготовленную суспензию сразу же закачивают в колонку под давлением (хроматографирование должно проводиться при таком же давлении).

4.4.3. МЕТОДИКА ПОДБОРА ЭЛЮИРУЮЩЕЙ СИСТЕМЫ

Это относительно сложная задача. Подбор элюирующей системы для ЖТХ лучше всего начать с просмотра литературы. Чтобы ускорить поиск растворителей, можно воспользоваться

Таблица 4.9

Примеры возможных элюотропных рядов для адсорбционной хроматографии на силикагеле [71]

ε^0	А	Б	В
0,00	Пентан	Пентан	Пентан
0,05	4,2% изопропилхлорида/пентан	3% CH_2Cl_2/пентан	4% бензола/пентан
0,10	10% изопропилхлорида/пентан	7% CH_2Cl_2/пентан	11% бензола/пентан
0,15	21% изопропилхлорида/пентан	14% CH_2Cl_2/пентан	26% бензола/пентан
0,20	4% эфира/пентан	26% CH_2Cl_2/пентан	4% этилацетата/пентан
0,25	11% эфира/пентан	50% CH_2Cl_2/пентан	11% этилацетата/пентан
0,30	23% эфира/пентан	82% CH_2Cl_2/пентан	23% этилацетата/пентан
0,35	56% эфира/пентан	3% ацетонитрила/бензол	56% этилацетата/пентан
0,40	2% метанола/эфир	11% ацетонитрила/бензол	
0,45	4% метанола/эфир	31% ацетонитрила/бензол	
0,50	8% метанола/эфир	Ацетонитрил	
0,55	20% метанола/эфир		
0,60	50% метанола/эфир		

Таблица 4.10

Примеры возможных элюотропных рядов для адсорбционной хроматографии на оксиде алюминия [71]

ε^0	А	Б	В
0,00	Пентан	Пентан	Пентан
0,05	8% изопропилхлорида/пентан	1,5% CH_2Cl_2/пентан	4% эфира/пентан
0,10	19% изопропилхлорида/пентан	4% CH_2Cl_2/пентан	9% эфира/пентан
0,15	34% изопропилхлорида/пентан	8% CH_2Cl_2/пентан	15% эфира/пентан
0,20	52% изопропилхлорида/пентан	13% CH_2Cl_2/пентан	25% эфира/пентан
0,25	5% метилацетата/пентан	22% CH_2Cl_2/пентан	38% эфира/пентан
0,30	8% метилацетата/пентан	34% CH_2Cl_2/пентан	55% эфира/пентан
0,35	13% метилацетата/пентан	54% CH_2Cl_2/пентан	81% эфира/пентан
0,40	19% метилацетата/пентан	84% CH_2Cl_2/пентан	4% пиридина/пентан
0,45	29% метилацетата/пентан	1% MeCN/эфир	8% пиридина/пентан
0,50	44% метилацетата/пентан	5% MeCN/эфир	13% пиридина/пентан
0,55	65% метилацетата/пентан	14% MeCN/эфир	20% пиридина/пентан
0,60	5% изопропанола/эфир	36% MeCN/эфир	32% пиридина/пентан
0,65	10% изопропанола/эфир	MeCN	
0,70	20% изопропанола/эфир		
0,75	3% метанола/эфир		
0,80	7% метанола/эфир		
0,85	17% метанола/эфир		
0,90	40% метанола/эфир		

монографиями, например [19, 49, 71], или обратиться к справочным и библиографическим разделам Journal of Chromatography. Выяснив, какие растворители применяются для хроматографирования соединений данного типа, следует провести предварительное разделение методом ТСХ. Затем полученные данные, анализируют и при необходимости модифицируют выбранные системы. При градиентном или ступенчатом элюировании методом ЖХВД часто необходимо, чтобы элюирующая способность растворителя возрастала. Для этой цели очень удобны составленные Снайдером [71] элюотропные ряды растворителей для ЖТХ. Примеры таких элюотропных рядов для хрома-

тографии на силикагеле и оксиде алюминия даны в табл. 4.9 и 4.10. Очевидно, например, что на силикагеле одной и той же элюирующей способностью обладают 4%-ный раствор эфира в пентане, 26%-ный раствор дихлорметана в пентане и 4%-ный раствор ацетилацетата в пентане.

Рассмотрим в качестве примера разделение методом ЖХВД на силикагеле двух соединений с удовлетворительным коэффициентом емкости k' и коэффициентом разделения α, близким к единице. На хроматограмме, полученной при элюировании 4%-ным раствором эфира, пики таких соединений недостаточно хорошо разделены. Поэтому следует улучшить α, меняя состав элюирующей системы. В такой ситуации всегда необходимо заменить наиболее полярный компонент, сохранив при этом элюирующую способность системы (выражаемую параметром ε^0). С этой целью целесообразно, например, определить, как влияет на α переход к системе с 4% этилацетата в пентане или 26% дихлорметана в пентане. Нельзя ожидать, что замена пентана, например, на гексан окажет существенное влияние на α. При длительном хроматографировании методом классической колоночной хроматографии или при повторном разделении методом ЖХВД с безводными растворителями или системами растворителей вода из колонки постепенно удаляется, что ухудшает хроматографические свойства колонки. Это явление особенно важно при работе с неполярными системами растворителей, когда эффективность колонки сильно зависит от содержания воды в адсорбенте и когда содержание воды убывает с возрастанием полярности элюирующих систем. Для сильнополярных растворителей этот эффект незначителен. Чтобы предотвратить его, можно или добавлять воду к растворителям или, что еще лучше, предварительно насыщать элюирующую систему водой в специальной колонке.

4.4.4. МЕТОДИКА ХРОМАТОГРАФИИ И ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

КЛАССИЧЕСКАЯ КОЛОНОЧНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Смеси веществ, подлежащих хроматографированию, следует высушить и взвесить. Существуют три возможных способа приготовления пробы и введения ее в колонку. *а)* Пробу растворяют в возможно менее полярном растворителе, чтобы получить концентрированный раствор, который затем пипеткой вводят в хроматографическую колонку. Сосуд, в котором была растворена проба, и пипетку ополаскивают небольшим количеством растворителя, который также вводят в колонку. Когда введенный раствор впитается, можно начинать собственно хро-

матографирование. *б)* Если проба только частично растворима или почти нерастворима в неполярном растворителе, то ее растворяют в минимальном количестве полярного растворителя и полученный раствор разбавляют неполярным растворителем. Если при этом часть пробы выпадает в осадок, то в колонку вводят верхний жидкий слой и повторяют ту же операцию. *в)* Если проба слишком вязка или если это смесь соединений самой различной полярности, то ее растворяют в возможно более летучем полярном растворителе, например эфире, этилацетате, хлороформе, и полученный раствор смешивают с адсорбентом (примерно половина количества растворителя) с такими же характеристиками, что и адсорбент в колонке. Растворитель испаряют под вакуумом при комнатной температуре, и оставшийся адсорбент становится легкоподвижным (сыпучим). Если необходимо, разбавляют адсорбент с нанесенной пробой свежим адсорбентом и вводят его сверху в колонку таким же способом, каким проводилось первоначальное заполнение ее.

Начинать хроматографирование следует наименее полярным растворителем, обычно петролейным эфиром. Скорость отбора фракций зависит от типа и масштаба хроматографического процесса. Обычно скорость течения, измеренная в мл/ч, должна быть численно равна массе (г) использованного адсорбента. Большинство адсорбентов не затрудняет течение элюента по колонке. При применении некоторых особо тонкодисперсных адсорбентов, например оксида магния, может потребоваться введение вспомогательного фильтра, например кизельгурового. Для отбора элюата пригодны сборники фракций любого типа (см. гл. 8). Объем одной фракции устанавливают в соответствии с характером задачи и регулируют или с помощью переключателя с часовым механизмом при сборнике фракций, или путем изменения (притом только уменьшения) скорости потока элюента. Отобранные в течение определенных интервалов фракции анализируют методами ТСХ или ГЖХ, разработанными для данной методики разделения, и объединяют идентичные по составу фракции. Из объединенных фракций отгоняют растворитель посредством обычной или вакуумной перегонки в роторном испарителе при низкой температуре. Элюирование продолжают до тех пор, пока не перестанет элюироваться хроматографируемая проба. После этого элюирующую способность смеси увеличивают, повышая содержание более полярного компонента системы, который подают или в несколько порций, или постепенно (градиентное элюирование; описание аппаратуры для градиентного элюирования см. в разд. 8.4 или в работе [45а]). Основное преимущество градиентного элюирования — это подавление образования «хвостов» сильно адсорбируемых

соединений и возможность элюирования таких соединений в виде относительно узких зон.

Твердые или маслянистые остатки, полученные после упаривания объединенных фракций, растворяют в подходящем растворителе и эти растворы вводят количественно в пробирки с целью кристаллизации или дальнейшей обработки. Для этого применяются соответствующие пипетки, например пипетки Пастера, снабженные резиновыми сосками. Чистоту продуктов проверяют методами ТСХ, ГХ или ЖХВД, и если она достаточна, то характеризуют эти продукты с помощью соответствующих физических методов или проводят дальнейшее их исследование.

Каждый эксперимент по хроматографическому разделению следует описать в лабораторном журнале; причем необходимо указать все условия эксперимента, например: массу пробы, внутренний диаметр и длину колонки, тип адсорбента, его массу, размер частиц, активность, откуда получен адсорбент и т. п. Следует также указать, какие растворители использовались, число фракций, их объемы, массу остатков отдельных или объединенных фракций, важнейшие особенности фракций, например их окраску, способность к частичной или полной кристаллизации и т. д.

ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ВЫСОКОГО ДАВЛЕНИЯ (ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ)

На рис. 4.5 показана схема прибора для ЖХВД, выпускаемого фирмой Hewlett-Packard. Конструкции насоса, приспособления для ввода пробы, вентилей высокого давления и детектора, а также принципы их действия в общих чертах рассматриваются в главе 8. Когда элюент под давлением проходит через колонку, анализируемая проба (1—25 мкг, концентрация 0,1—10%) впрыскивается микрошприцем внутрь приспособления для ввода. Пробы большого объема или высоковязкие пробы вспрыскивают через специальный многоходовой кран, соединенный с сосудом, содержащим пробу. Как только проба попадает в колонку, через нее вновь пропускают элюент.

Приготовление проб. Прежде всего из пробы удаляют примеси, загрязняющие колонку и снижающие ее производительность или эффективность. С этой целью пробу фильтруют или элюируют через очень короткую колонку, заполненную силикагелем. Пробу обычно растворяют в наименее полярном из возможных растворителей.

Температура системы. Температура системы часто оказывает влияние на относительное удерживание растворенных веществ, и поэтому целесообразно на стадии предварительных опытов подобрать такой температурный режим, который позволил бы получить оптимальное разрешение.


26

15
16
17
18
18
12
13
14
14
13
5
6
7
M
9
8
19
20
21
22
23
24
25
11
11
10
N_2
2
3
4
1
M
1
M
27

Размер пробы. В аналитической ЖХВД обычно работают с пробами объемом 1—10 мкл. При препаративном разделении объем пробы значительно больше (см. ниже пример применения препаративной ЖХВД).

Разделение. При прохождении через колонку компоненты смеси образуют отдельные зоны. Разделение необходимо проводить при непрерывном отборе фракций, так как при этом исключается возможность повторного смешивания уже разделенных соединений, приводящего к уменьшению разделяющей способности колонки. Эффективность разделения в очень большой степени зависит от величины «мертвого объема», который слагается из объемов свободного пространства между местом ввода пробы и собственно колонкой, между колонкой и детектором, а также объема соединительных трубок в детекторе. Мертвый объем должен быть возможно меньше.

Если время удерживания $t_R(1)$ и $t_R(2)$ — это время, в течение которого данные соединения находятся в колонке, t_0 — время элюирования неудерживаемой подвижной фазы растворяющей системы, w_1 и w_2 — ширина соответствующих хроматографических пиков, измеренная на высоте, равной 0,6065 высоты пика, то разрешение определяется как

$$R_s=[t_R(2)-t_R(1)]/(w_1+w_2)$$

(см. рис. 4.6).

Для получения хорошего разрешения требуется, чтобы хроматографические зоны были очень узкими (т. е. w должно быть мало), а расстояние между пиками хроматографических зон — достаточно большим (чтобы между пиками перо самописца могло возвращаться возможно ближе к нулевой линии).

Обнаружение. Выходящие из колонки разделенные компоненты поступают в детектор. Наиболее часто используются детекторы, регистрирующие изменения показателя преломления или коэффициента поглощения УФ-излучения определенной длины волны. В настоящее время начинают применять детекторы с переменной длиной волны.

Градиентное элюирование. Эта методика, широко применяемая в других типах хроматографии, например ионообменной

←

Рис. 4.5. Схема серийного жидкостного хроматографа высокого давления (публикуется с разрешения фирмы Hewlett-Packard).

1 — магнитная мешалка; *2* — резервуар для первого растворителя; *3* — склянка для слива отработанного растворителя; *4* — резервуар для второго растворителя; *5* — игольчатый вентиль для продувочного газа; *6* — вентиль для регулировки вакуума; *7* — насос высокого давления для подачи первого растворителя; *8* — насос высокого давления для подачи второго растворителя; *9* — мотор, приводящий в действие насосы; *10* — расходомер для растворителя; *11* — детектор; *12* — ротаметр для продувочного газа; *13* — обратный холодильник; *14* — демпфер; *15* — предохранительный клапан на линии для продувочного газа; *16* — вакуумметр; *17* — вакуумный насос; *18* — манометр; *19* — теплообменник; *20* — предварительная колонка; *21* — блок ввода пробы; *22* — разделительная колонка; *23* — колонка сравнения; *24* — колоночное отделение (термостатируется); *25* — делитель выходящей жидкости для препаративных работ; *26* — сборник фракций; *27* — самописец.

(см. гл. 5), недавно стала использоваться и в ЖХВД. Возможность применения градиентного элюирования следует учитывать уже при подборе насосов. В процессе градиентного элюирования состав элюента приходится менять как минимум дважды, а во многих случаях и чаще, в такой ситуации для подачи рас-

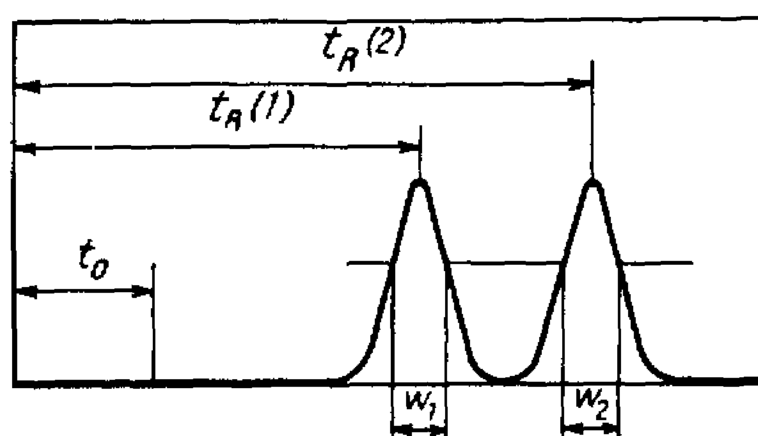


Рис. 4.6. Основные параметры ЖХВД.

t_R (1) и t_R (2) — время удерживания соединений 1 и 2; t_0 — время элюирования неудерживаемого растворителя; w_1 и w_2 — ширина соответствующих хроматографических пиков, измеренная на высоте, равной 0,6065 высоты пика.

творителей особенно удобны насосы с пропорциональным программированием.

Количественная оценка хроматограмм. В ЖХВД количественная оценка производится так же, как и в ГЖХ (см. гл. 10). Чаще всего используют внутренние стандарты и количество вещества рассчитывают по площади пика, с этой целью пик вырезают и взвешивают или же определяют его площадь планиметрированием или с помощью соответствующего интегратора (последний метод лучше всего). Относительно простой и вполне удовлетворительный интегратор для ЖХВД и ГЖХ недавно выпустила в продажу фирма Hewlett-Packard [73]. Этот прибор (интегратор HP, модель 3380 A) записывает хроматограмму на бумаге, печатает соответствующее время удерживания отдельных пиков, рассчитывает их площади заданным методом и на краю каждой хроматограммы печатает результаты всего анализа.

4.5. ПРИМЕРЫ РАЗДЕЛЕНИЯ МЕТОДОМ АДСОРБЦИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ РЯДА ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

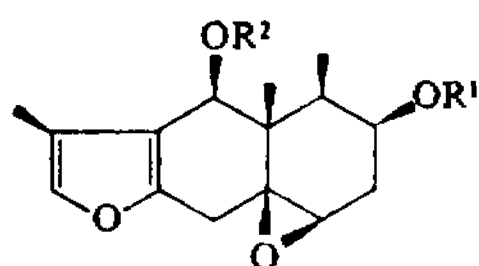
4.5.1. РАЗДЕЛЕНИЕ СЕСКВИТЕРПЕНОВ, СОДЕРЖАЩИХСЯ В КОРНЕВИЩАХ *Senesio nemorensis fuchsii* [53]

200 г экстракта, извлеченного петролейным эфиром из 23,5 кг сухих размолотых корневищ, хроматографировали в колонке с внутренним диаметром 6 см, заполненной оксидом алюминия

(фирмы Woelm, 5,5 кг, 6% воды). При градиентном элюировании растворителями с увеличивающейся элюирующей способностью этот экстракт удалось разделить на следующие 14 фракций (для каждой фракции указаны: растворитель; объем фракции, мл; масса остатка, г): *1)* петролейный эфир, 2000, 22,0; *2)* петролейный эфир, 2000, 3,5; *3)* петролейный эфир — бензол (1 : 1) 3000, 16,4; *4)* бензол, 1500, 9,5; *5)* бензол, 2500, 5.4; *6)* бензол, 1000, 8,0; *7)* бензол, 1500, 8,5; *8)* бензол, 2500, 10,8; *9)* бензол, 2500, 3,5; *10)* бензол с 5% этанола, 2000, 10,8; *11)* бензол с 5% этанола, 2000, 77,3; *12)* бензол с 5% этанола, 1000, 16,0; *13)* бензол с 5% этанола, 500, 4,5; *14)* бензол с 5% этанола, 1500, 2,6.

Анализ фракций методом ТСХ на силикагеле смесью петролейный эфир — диэтиловый эфир (4 : 1) показал, что фракции *4, 5—7* и *11—14* содержат фурановые сесквитерпены (обнаруживающие реагенты ОР-7 и ОР-15, см. гл. 9).

Часть фракции *11* (25 г) хроматографировали повторно на нейтральном оксиде алюминия (фирмы Woelm, 5 кг, 6% воды) смесью петролейный эфир — диэтиловый эфир (1 : 1) с отбором фракции объемом по 10—15 мл. Эти фракции анализировали методом ТСХ на силикагеле G (фирмы Merck) смесью петролейный эфир — диэтиловый эфир (6 : 4) при 5-кратном элюировании и затем соответствующим образом объединяли. В результате были получены следующие соединения: немозенин-А (I) (7,2 г, R_f=0,57), немозенин-В (II) (3,4 г, R_f=0,55), немозенин-С (III) (2,9 г, R_f=0,52). Хроматографирование при непрерывном круглосуточном отборе фракций длилось неделю.



I R^1 = H; R^2 ангелил

II R^1 = H; R^2 изобутирил

III R^1 = H; R^2 дигидроангелил

4.5.2. ЭКСТРАКЦИЯ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ В ИНЕРТНОЙ АТМОСФЕРЕ

При выделении оранжевых сесквитерпенов из *Lactarius deliciosus L.* большинство операций необходимо проводить в инертной атмосфере (CO_2), поскольку на воздухе эти соединения неустойчивы [80]. Исходный материал заранее, за 12—24 ч, замораживали сухим льдом, размалывали и экстрагировали не содержащим пероксидов холодным эфиром в экстракторе, показанном на рис. 4.7. Экстракт собирали в одногорлую колбу со шлифом, к которой присоединяли переходник с пробочным кра-

ном. Колбу предварительно продували CO_2. Колбу с экстрактором подсоединяли и продували CO_2 пространство над краном (см. рисунок). Экстракт выпаривали при комнатной температуре под вакуумом (рис. 4.8). Остаток отбирали из прибора через кран *К* с помощью «баллончика» (капиллярной трубки, в средней части которой выдут шарик), предварительно перекрыв кран, соединяющий сборник с остальной системой. Отбор вели, непрерывно подавая CO_2 в эту часть прибора.

Хроматографическое разделение также проводили в инертной атмосфере CO_2 в приборе, показанном на рис. 4.9. Хрома-

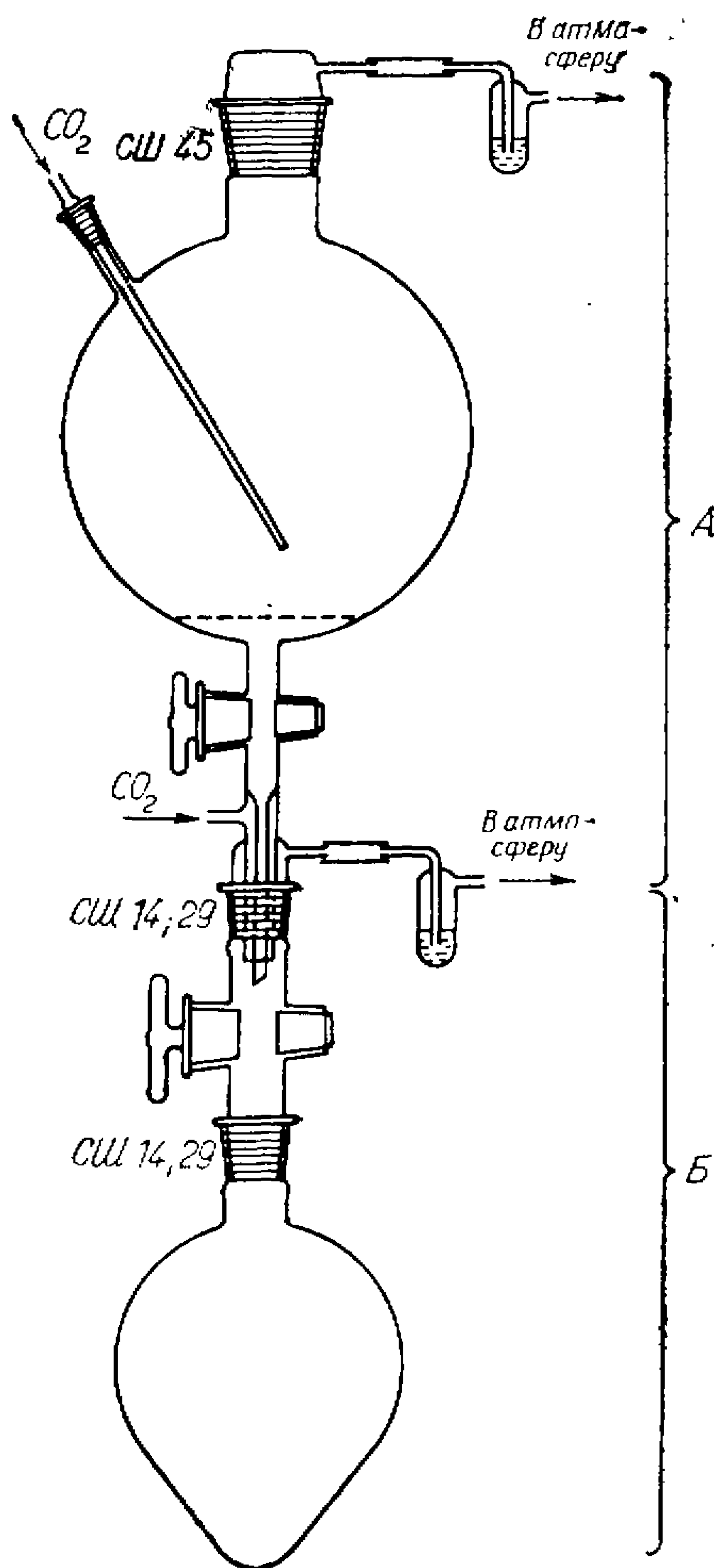


Рис. 4.7. Прибор для экстракции в инертной атмосфере с присоединенной перегонной колбой, предназначенной для непосредственного сбора экстракта.
А — экстрактор; *Б* — перегонная колба с соединительным устройством.

тографическую колонку заполняли суспензией адсорбента в гексане, насыщенном CO_2. Сосуд для элюента был так устроен, что поступающий в колонку элюент можно было предварительно насытить CO_2. Сосуд для элюента *А* заполняли при закрытом кране *К* таким образом, чтобы поверхность элюента была возможно ближе к шлифу для пробки. Когда затем вставляли пробку и открывали кран *К*, элюент поступал из со-

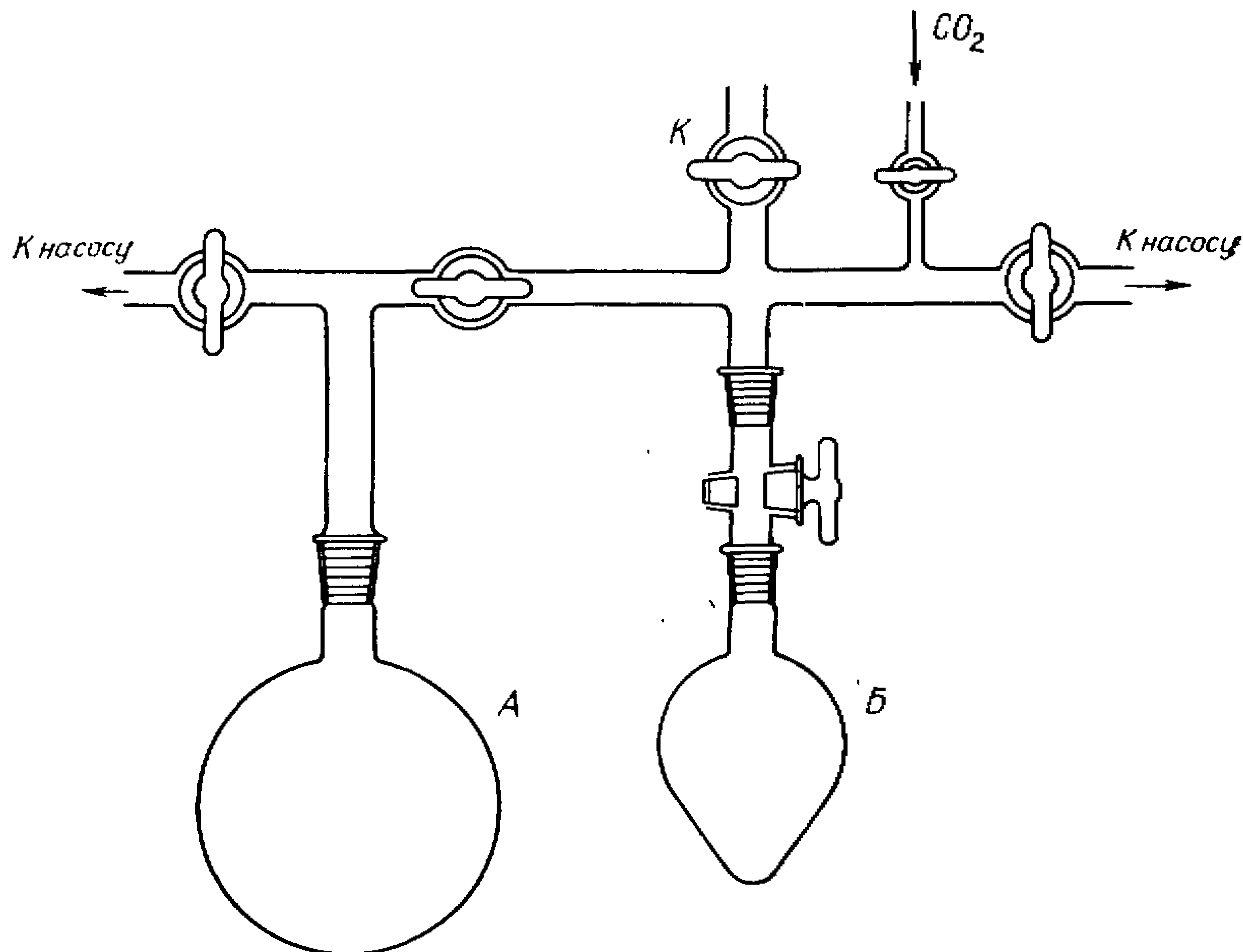


Рис. 4.8. Установка для перегонки экстрактов или хроматографических фракций при низкой температуре в условиях, исключающих попадание кислорода воздуха.

А — сборник конденсата, охлаждаемый твердым CO_2; *Б* — перегонная колба от прибора, показанного на рис. 4.7; *К* — стеклянный кран.

суда *А* в колонку. После того как вытекал весь элюент, сосуд опять заполняли до уровня пробки.

Перед введением пробы колонку промывали элюентом из указанного сосуда, пробу вводили в колонку через этот сосуд с помощью «баллончика» против потока CO_2.

Сборник фракций представлял собой калиброванный сосуд с пробочным краном внизу. Сборник соединялся с колонкой сферическим стеклянным шлифом (см. рис. 4.9). Перед началом хроматографирования сборник также продували CO_2. Перевод элюента в перегонную колбу и отгонку растворителя проводили так же, как и при предшествующей экстракции.

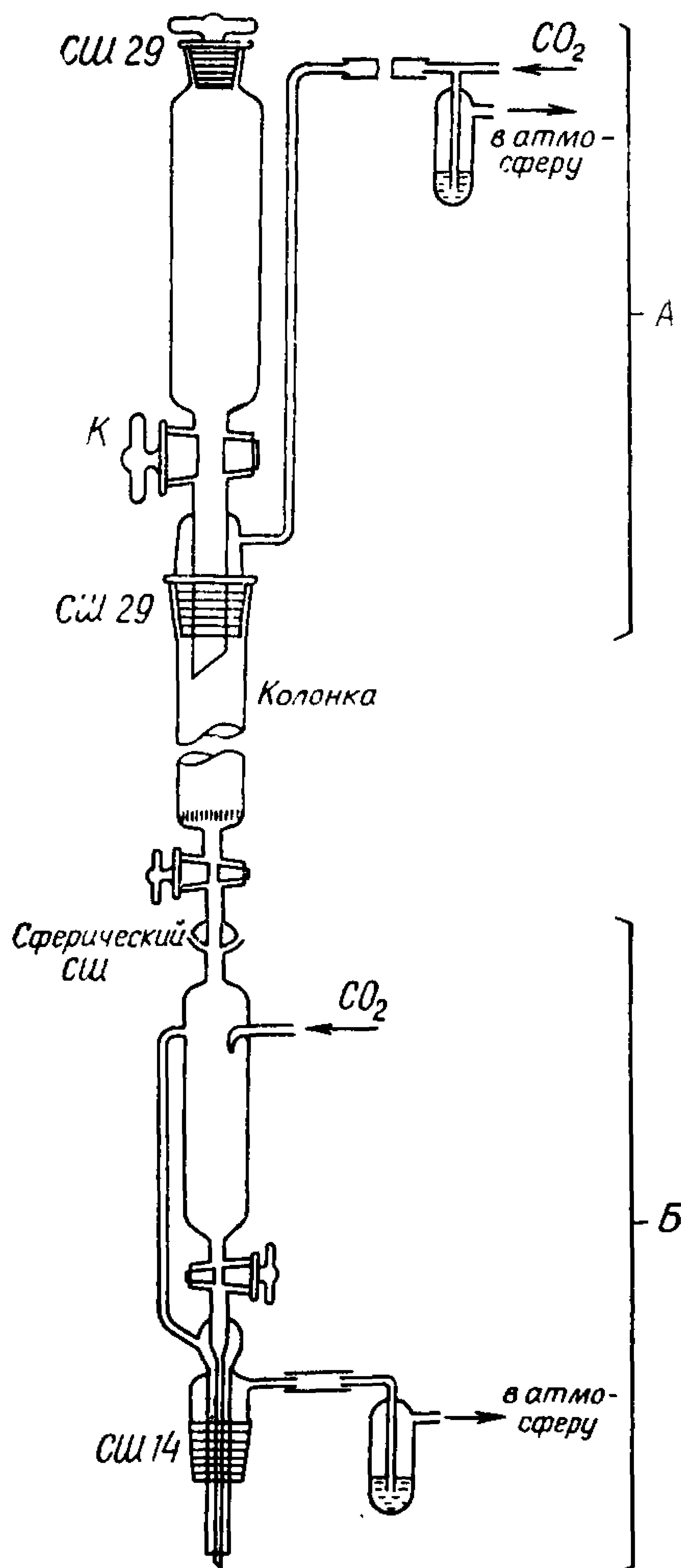


Рис. 4.9. Установка для хроматографирования в инертной атмосфере.
А — сосуд с элюентом; *Б* — система для сбора фракций; *К* — кран.

Свежесобранные *Lactarius deliciosus L.* (3,5 кг) смешивали в сосуде Дьюара с твердым CO_2 и оставляли там на 12 ч. Замерзший материал размалывали и экстрагировали эфиром. После испарения растворителя получали 24 г коричнево-красного полукристаллического остатка, который хроматографировали на 350 г силикагеля, содержащего 15% воды. Хроматографические фракции 2 и 4 (по 200 мл каждая), полученные при элюировании смесью петролейный эфир — диэтиловый эфир (9 : 1), после двукратного хроматографирования на нейтральном оксиде алюминия (активность III—IV) дали 0,8 г сложного эфира состава $C_{33}H_{52}O_2$.

4.5.3. ХРОМАТОГРАФИЯ В КОЛОНКЕ, ЗАПОЛНЕННОЙ ИОНООБМЕННИКОМ В Ag^+-ФОРМЕ

В статье Хоу и др. [36] описано разделение методом жидкостной хроматографии низкого давления на колонках, заполненных крупнопористым ионообменником леватит SP 1080 (фирма Merck) в Ag^+-форме, оптических изомеров алкен-1-олацетатов (половых аттрактантов). Этот способ хроматографирования имеет ряд преимуществ по сравнению с хроматографиро-

Таблица 4.11

Объемы удерживания соединений гомологического ряда эфиров уксусной кислоты и насыщенных первичных спиртов, а также их ненасыщенных производных с двойной связью в положении 9, полученные при хроматографировании на катионообменнике в Ag^+-форме[а] [36]

Ацетат	Объем удерживания[б], мл	Относительный объем удерживания[в]
Деканола-1	28,0	1,00
9-Деценола-1	135,2	4,83
Ундеканола-1	28,0	1,00
транс-9-Ундеценола-1	46,2	1,65
цис-9-Ундеценола-1	88,2	3,15
Додеканола-1	28,0	1,00
транс-9-Додеценола-1	46,2	1,65
цис-9-Додеценола-1	85,4	3,05
Тридеканола-1	28,0	1,00
транс-9-Тридеценола-1	43,4	1,55
цис-9-Тридеценола-1	72,1	2,58
Тетрадеканола-1	28,0	1,00
транс-9-Тетрадеценола-1	40,6	1,45
цис-9-Тетрадеценола-1	67,9	2,43
Пентадеканола-1	28,0	1,00
транс-9-Пентадеценола-1	39,9	1,43
цис-9-Пентадеценола-1	63,7	2,28

[а] Условия разделения: колонка размером 150×0,6 см, заполненная катионообменником леватит SP 1080 (Ag^+), размер частиц 0,075—0,090 мм; элюент — метанол, скорость потока 0,70 мл/мин; температура 13 °С; объем пробы 4 мкл; детектор — дифференциальный рефрактометр.

[б] Суммарный объем удерживания после ввода пробы.

[в] Отношение объема удерживания данного соединения к объему удерживания этанола или другого насыщенного спирта, т. е. соединений, не удерживаемых в колонке.

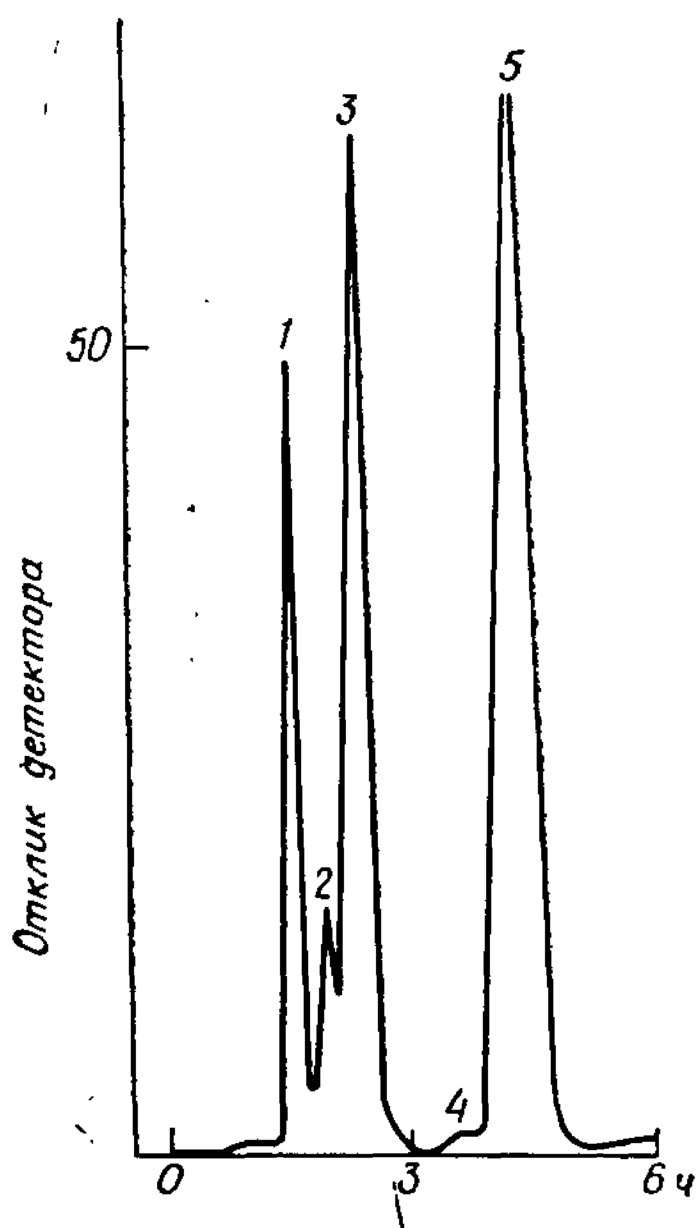


Рис. 4.10. Разделение смеси эфиров ненасыщенных спиртов на сорбенте, содержащем серебро [36].

Колонка 150×0,6 см; катионообменник леватит SP1080 (Ag+); размер частиц 0,075—0,090 мм; элюент — метанол; скорость потока 0,29 мл/мин; температура 13 °С; детектор — дифференциальный рефрактометр, чувствительность 4×; объем пробы 4 мкл. Состав анализируемой пробы: *1* — тетрадеканол-1-ацетат; *2* — неидентифицированные соединения; *3* — транс-11-нитродеценол-1-ацетат; *4* — тетрадеценол-1-ацетат; *5* — цис-11-тетрадеценол-1-ацетат.

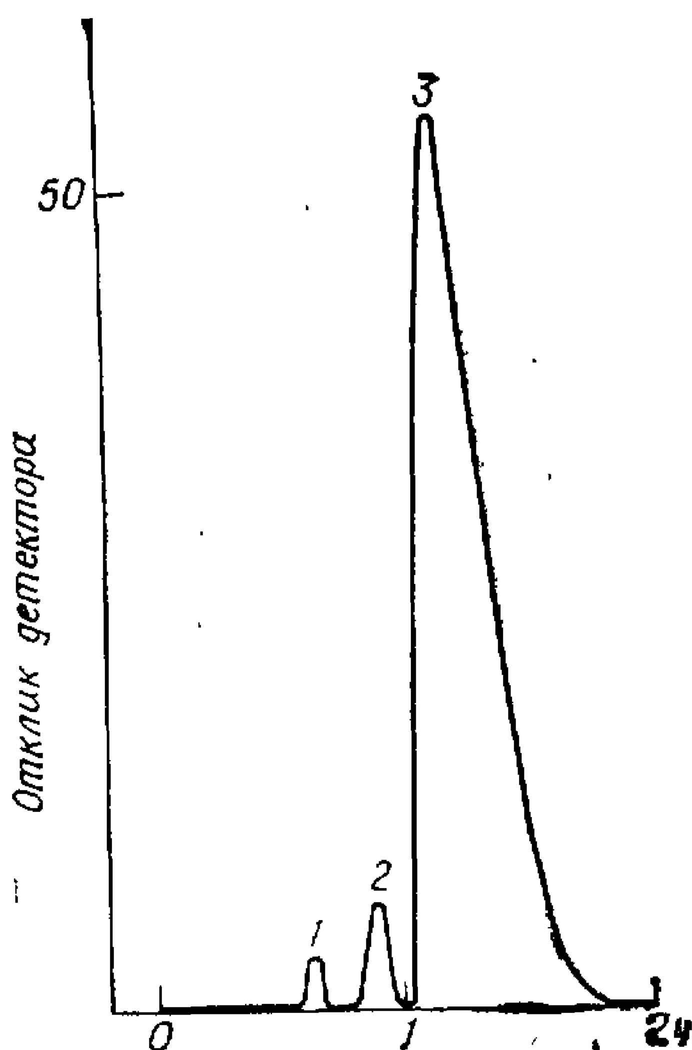


Рис. 4.11. Выделение из пробы большого объема *цис*-11-тетрадеценол-1-ацетата на сорбенте, содержащем серебро [36].

Объем пробы 150 мкл; скорость потока 0,74 мл/мин; чувствительность детектора 128×. Остальные условия см. в подписи к рис. 4.10.

Выделены ацетаты: *1* — тетрадеценола-1; *2* — транс-11-тетрадеценола-1; *3* — цис-11-тетрадеценола-1.

ванием на силикагеле или флоризиле, пропитанных раствором нитрата серебра (см. разд. 4.2.1 и 4.2.2).

Во-первых, разделение происходит значительно быстрее, и даже при перегруженных колонках соединения элюируются четкими зонами, и образования «хвостов» не наблюдается. Во-вторых, за ходом хроматографирования легко можно было следить с помощью дифференциального рефрактометра. В-третьих, правильно приготовленная колонка обладает отличной стабильностью. Разделение на ионообменниках такого типа происходит, по-видимому, принципиально по другому механизму: ионы серебра образуют π-комплексы с олефинами, и картина усложняется, например, адсорбцией, обусловленной наличием у хроматографируемого соединения других полярных групп. На рис. 4.10 и 4.11 показаны хроматограммы, полученные этим методом, в табл. 4.11 приведены результаты разделения ряда эфиров уксусной кислоты и алифатических спиртов, а ниже мы рассмотрим методику разделения.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ НАСАДКИ

Чтобы удалить из ионообменника влагу, навеску смолы (леватит SP 1080, фракция 0,07—0,15 или 0,1—0,2 мм) суспендируют в метаноле и затем промывают последовательно метанолом (2 порции по 700 мл на литр смолы), смесью хлороформа и метанола (2 : 3) и в заключение еще раз метанолом. Смолу отфильтровывают на воронке Бюхнера и сушат при 80 °C примерно 12 ч. Высушенный ионообменник делят на три фракции с частицами размером 0,075—0,090, 0,105—0,125 и 0,175—0,250 мм. Выбранной фракции дают набухнуть в воде и после этого загружают в колонку с внутренним диаметром 2,5 мм. Через заполненную леватитом колонку пропускают 0,4 М раствор нитрата серебра, пока в элюате не появятся первые ионы серебра. Далее колонку промывают сначала дистиллированной водой, пока не прекратится элюирование ионов серебра, а затем метанолом (тремя объемами адсорбента). При пропускании метанола выделяются пузырьки газа, и в результате этого объем насадки уменьшается до 85% (по сравнению с объемом, который она занимала в воде). Установлено, что 1 мл набухшей смолы содержит 1,8 г-ион/л Ag^+. Обезгаженной таким образом смолой авторы [36] заполняли обычным способом стеклянные колонки размером 150×0,6 см. Фракцией 0,105—0,125 мм заполняли полипропиленовую колонку размером 210×1,2 см. Смолу в колонке закрепляли тампоном тефлонового волокна. Элюент подавался в колонку поршневым насосом, обнаружение осуществлялось дифференциальным рефрактометром. В качестве подводящих трубок использовались трубки из силиконовой резины.

4.5.4. РАЗДЕЛЕНИЕ ГЛИКОЗИДОВ КАРОТИНОИДОВ НА ОКСИДЕ МАГНИЯ

Клейнинг и Рейхенбах [40] описали методику выделения индивидуальных третичных гликозидов каротиноидов, полученных из культур микобактерий. Необработанный ацетоновый экстракт, содержащий смесь самых различных соединений, сначала хроматографируют смесью петролейного и диэтилового эфиров (1 : 2) на колонке (8×2 см) с силикагелем с тем, чтобы выделить из смеси каротиноиды, не связанные с гликозидами,

Таблица 4.12

Структурые формулы переацетилированных гликозидов каротиноидов и их величины R_f [40][а]

Соединения	Структурная формула	R_f
А	...$O-R_1$	0,68
Б	...$O-R_2$	0,55
В	...$O-R_2$	0,45
Г	CH_3CO-O...$O-R_1$	0,41
Д	...$O-R_2$	0,36
Е	O...$O-R_2$	0,23
Ж	CH_3CO-O...$O-R_2$	0,20
З	...$O-R_2$	0,15
И	CH_3CO-O, O...OR_3, OH	0,54

[а] Получены методом ТСХ на оксиде магния (фирма Merck, Дармштадт, ФРГ) элюированием смесью петролейный эфир — бензол — метанол (40 : 10 : 1).

[б] R_1 — рамнозилперацетат; R_2 — глюкозилперацетат; R_3 — метилпентозилперацетат.

и неполярные липиды (содержание последних довольно велико). Далее эфиром и смесями эфира с ацетоном (с возрастающей долей ацетона) вымывают гликозиды каротиноидов. В этих условиях фосфолипиды остаются адсорбированными в колонке. Гликозиды каротиноидов, выделенные из микобактерий, обычно этерифицируются различными жирными кислотами по одной из гидроксильных групп глюкозы. Поэтому эти эфиры необходимо омылить этанольным раствором гидроксида калия. Очень важной стадией является ацетилирование гликозидов уксусным ангидридом и пиридином. При этом сахарная, т. е. гидрофильная, часть молекулы становится липофильной и образующиеся ацетилированные гликозиды лучше поддаются дальнейшему разделению. Выделенные фракции повторно хроматографируют на силикагеле, однако полученные в результате фракции все-таки представляют собой смеси трех или более компонентов. Получить фракции индивидуальных компонентов можно, хроматографируя эти смеси на оксиде магния (колоночная или тонкослойная хроматография). В табл. 4.12 приведены все идентифицированные гликозиды каротиноидов, выделенные из микобактерий, а также их величины R_f, полученные на тонких слоях оксида магния элюированием смесью петролейный эфир (т. кип. 60—70 °C) — бензол — метанол (40 : 10 : 1). Подобную же смесь используют и в колоночной хроматографии. Колонку заполняют смесью (1 : 1) оксида магния и кизельгура (фирмы Merck, Дармштадт, ФРГ). Как видно из табл. 4.12, каждая дополнительная сопряженная двойная связь в молекуле уменьшает R_f, а циклизация молекулы увеличивает ее. Соединения *В*, *Д* и *З*, перемещающиеся при хроматографии на силикагеле, как одна зона, легко разделяются этим методом. Различные типы ацетилированных гидроксильных групп (в соединениях *А*, *В*, *Г* и *Ж*) или карбонильная группа приводят к различному по величине замедлению движения хроматографируемого вещества. Очевидно, характер гликозидной связи также существенно влияет на величину R_f.

4.5.5. РАЗДЕЛЕНИЕ КОРРИНОИДОВ МЕТОДОМ ПРОЯВИТЕЛЬНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ НА НЕПОЛЯРНОМ АДСОРБЕНТЕ АМБЕРЛИТ XAD-2

Фогельман и Вагнер [79] провели препаративное разделение корриноидов методом проявительной хроматографии на колонках с амберлитом XAD-2 (размер частиц 50—100 мкм). Сначала пробу элюируют водой, чтобы выделить неорганические и полярные органические соединения, после этого можно разделять корриноиды градиентным элюированием растворами *трет*-бутанола в воде (3—20% по объему) или смесями растворите-

Таблица 4.13

Величины R[а] кислых дицианокорриноидов[б] [79]

Соединение	Содержание *трет*-бутанола в элюенте, об. %		
	3,5	5	7
Дицианокобинамид	0,03	0,07	0,45
Дицианокобаламид	0,002	—	0,14
Дициано-*п*-крезилкобамид (фактор Ib)	—	—	0,042
abcdg-Пентамид дицианокобиновой кислоты	—	0,10	—
acdg-Тетрамид дицианокобиновой кислоты	—	0,32	—
acg-Триамид дицианокобиновой кислоты	—	0,62	—
Дициано-Р-1-кобннамид-Р-2-гуанозин-5′-пирофосфат	0,26	—	—
Дицианокобинамидфосфат	0,52	—	—
Дицианокобинамидпирофосфат	0,70	—	—

[а] $R = \frac{\text{Скорость перемещения соединения в колонке, см/мин}}{\text{Скорость потока растворителя, мл/мин (мл/мин·см}^2\text{)}}$

[б] Условия разделения: колонка размером 10×1,5 см, заполненная амберлитом XAD-2 (50—100 мкм); элюент — 1/15 М фосфатный буферный раствор (pH 6,5) с 0,01% KCN; скорость потока 0,1 мл/мин.

лей. Этот метод пригоден для разделения всех типов корриноидов — кислых, нейтральных и основных. Однако целесообразнее разделять биологическую смесь на отдельные компоненты на ионообменной целлюлозе. Указанные авторы описали хроматографические характеристики 50 различных корриноидов и изучили влияние заместителей в положениях С-8, С-10 и С-13, аксиальных лигандов и нуклеотидов. В качестве примера в табл. 4.13 дана сводка величин R_f кислых дицианокорриноидов.

4.5.6. ЖИДКО-ТВЕРДОФАЗНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ВЫСОКОГО ДАВЛЕНИЯ НА КЛАССИЧЕСКИХ И ПОВЕРХНОСТНО-ПОРИСТЫХ СОРБЕНТАХ

Примеры анализа этим методом смесей природных соединений, очень близких по структуре, недавно опубликованы Уордом и Пелтером [83]. Они исследовали смеси флавоноидов, пептидов, порфиринов и сахаров и показали, что адсорбционная хроматография — эффективный метод разделения этих соединений. Эти авторы сравнили также результаты, полученные на полностью пористых и поверхностно-пористых адсорбентах. Для разделения они применяли стеклянные колонки (внутрен-

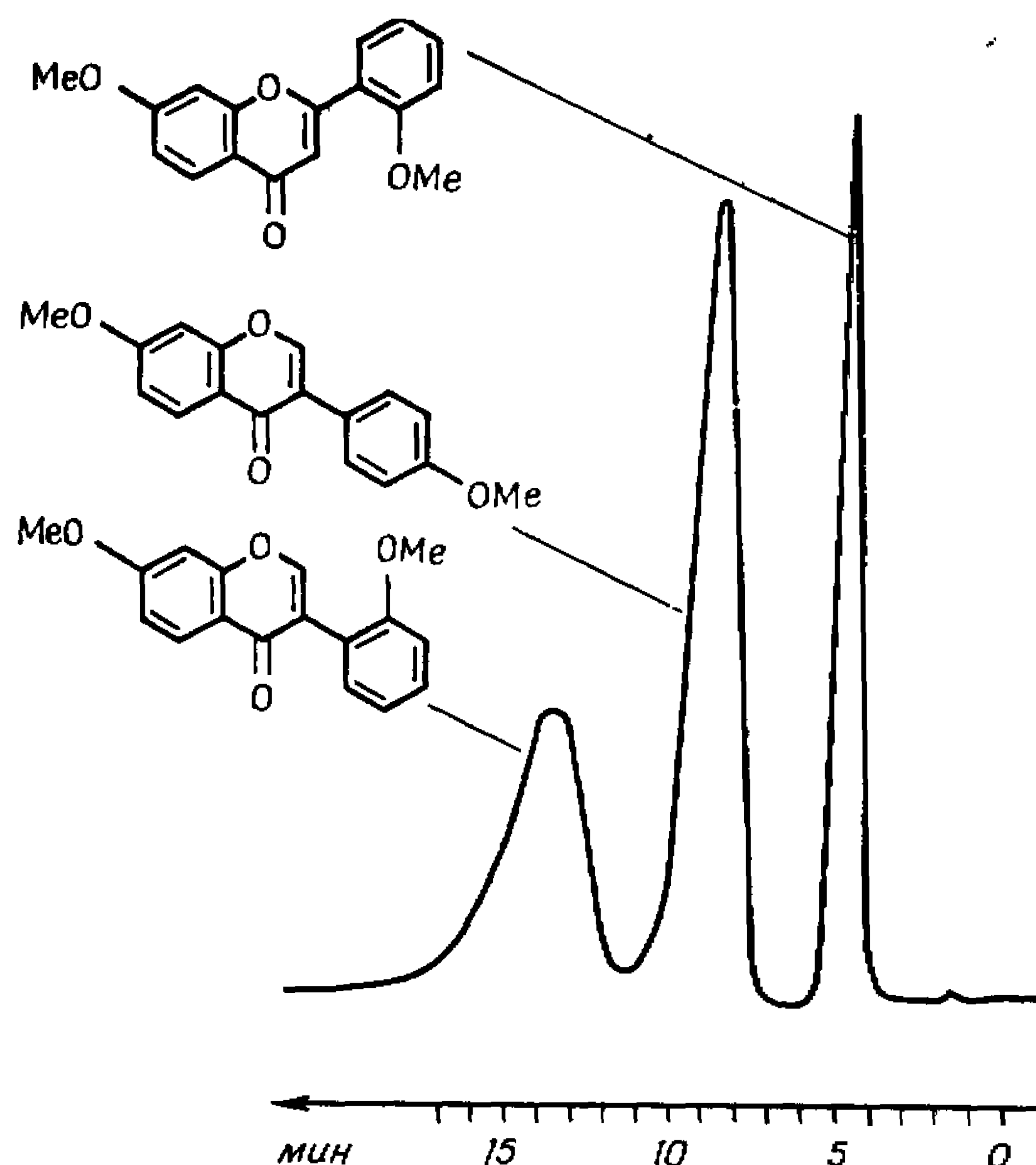


Рис. 4.12. Разделение смеси изомерных флавонов и изофлавонов [83].
Колонка 45×0,4 см; сорбент — меркосорб SI; элюент — диизопропиловый эфир; скорость потока 2,5 мл/мин; давление 34,4 атм; детектор — дифференциальный рефрактометр.

ний диаметр 4 мм) с тефлоновыми переходниками. Элюент подавался в колонку поршневым насосом, снабженным демпфирующим устройством. Обнаружение проводилось с помощью УФ-детектора (254 или 280 нм) или дифференциального рефрактометра.

На рис. 4.12—4.14 показаны результаты разделения смесей изомерных флавонов и изофлавонов (рис. 4.13), бифлавоноидных производных (рис. 4.13) и арилкумаринов (рис. 4.14). Последние две хроматограммы демонстрируют преимущества по верхностно-пористых (пелликулярных) адсорбентов: повышается разделяющая способность, сокращается длительность анализа. Результаты применения полиамида как сорбента для разделения халькконов и флаванонов показаны на рис. 4.15. Как правило, взаимное превращение халькконов и флаванонов катализируется кислотами и основаниями. Полное превращение одного соединения в другое происходит редко, и поэтому разделить смесь на отдельные компоненты часто очень трудно. На рис. 4.15 показаны хроматограммы такой смеси, полученные при разделении на порошкообразном полиамиде (рис. 4.15, *а*) и поверхностно-пористом полиамиде пеллидоне (рис. 4.15, *б*). В последнем случае смесь разделяется значительно быстрее и четче.

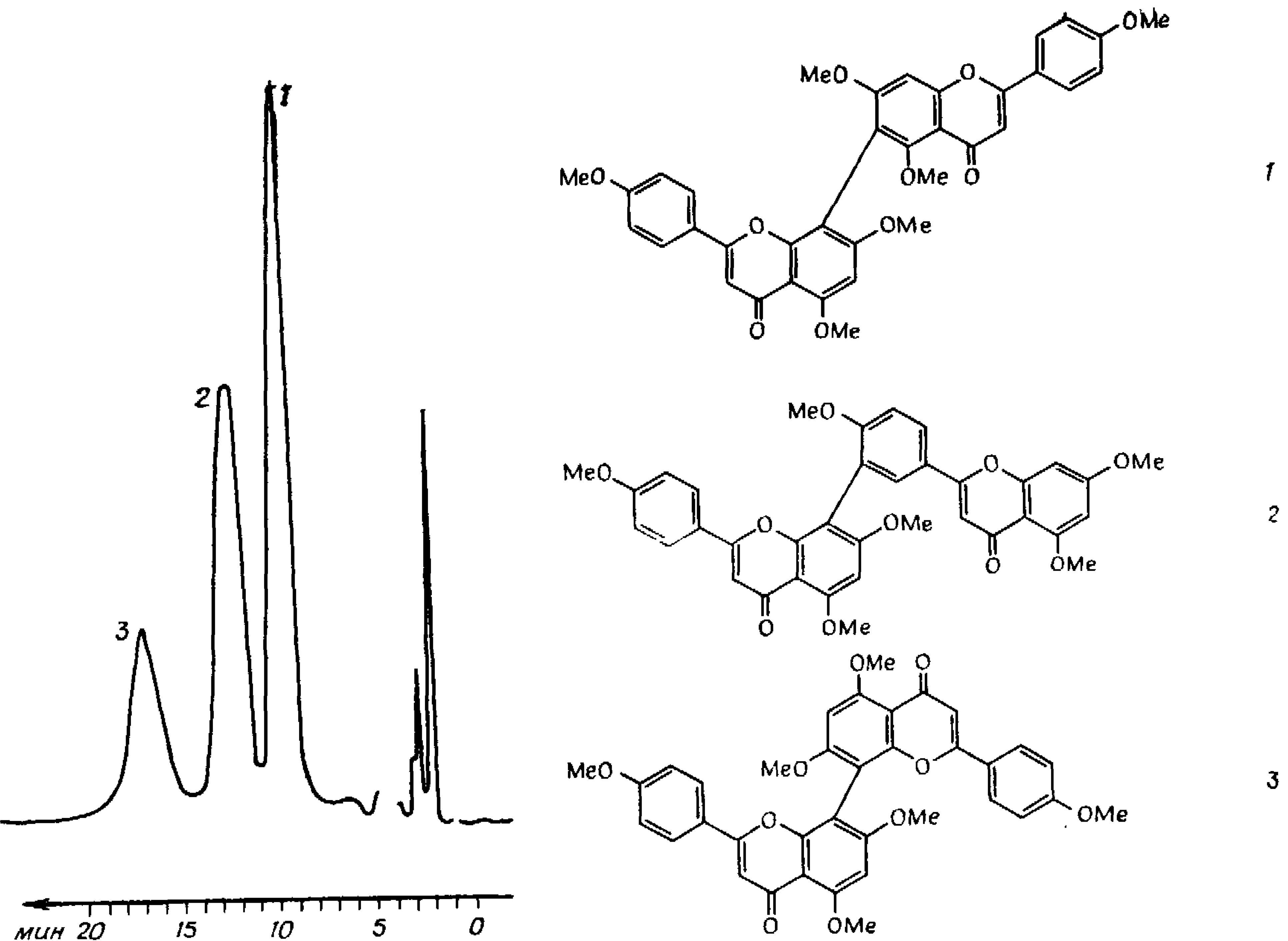


Рис. 4.13. Разделение смеси бифлавоноидных соединений [83].

Колонка 100×0,4 см; сорбент — пеллосил НС; элюент — диизопропиловый эфир — метанол (92 : 8); скорость потока 2,5 мл/мин; давление 20,4 атм; детектор — дифференциальный рефрактометр.

Выделены гексаметиловые эфиры: *1* — агатисфлавона, *2* — аментофлавона, *3* — купрессуфлавона.

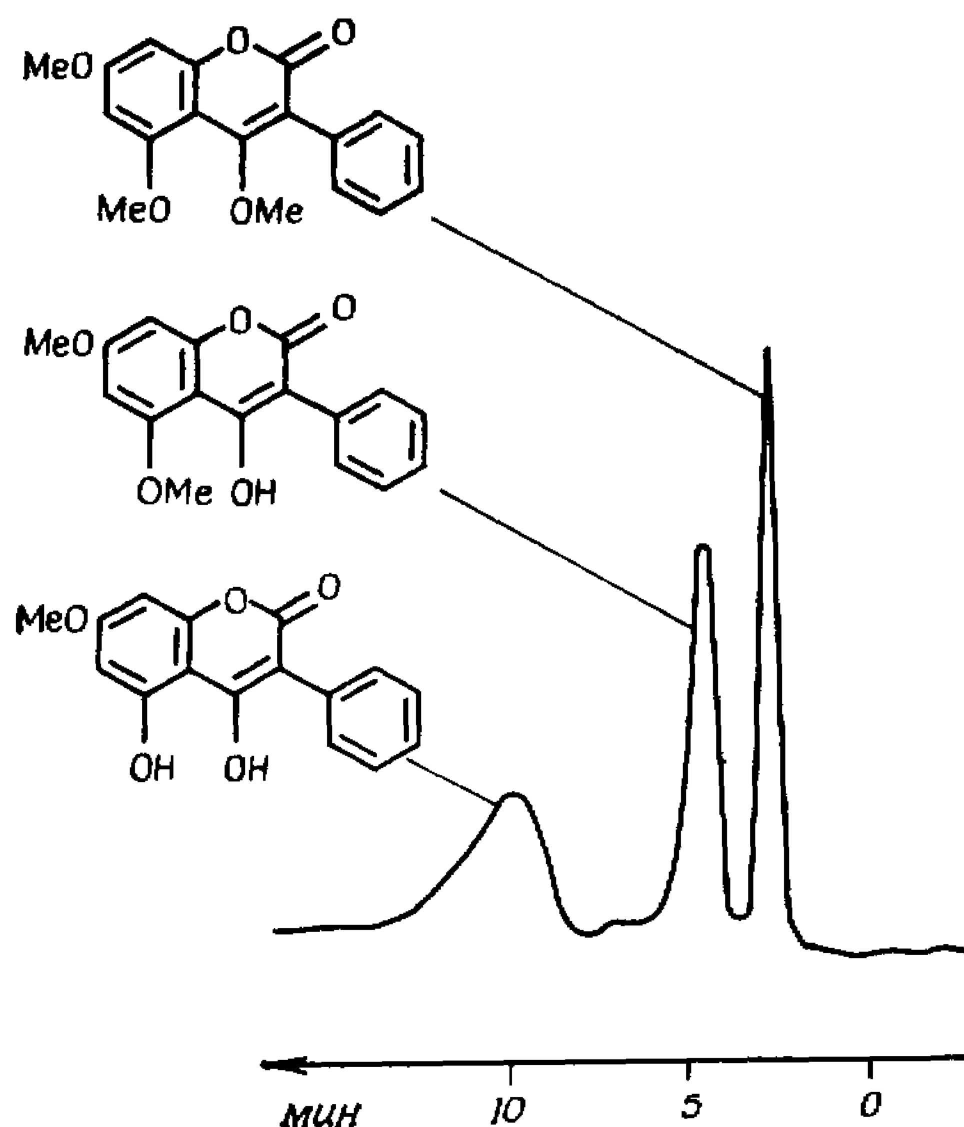


Рис. 4.14. Разделение смеси трех арилкумаринов [83].

Колонка 100×0,4 см; сорбент — пеллосил НС; элюент — пентан — диоксан (3 : 1); давление 10,2 атм; детектор — дифференциальный рефрактометр.

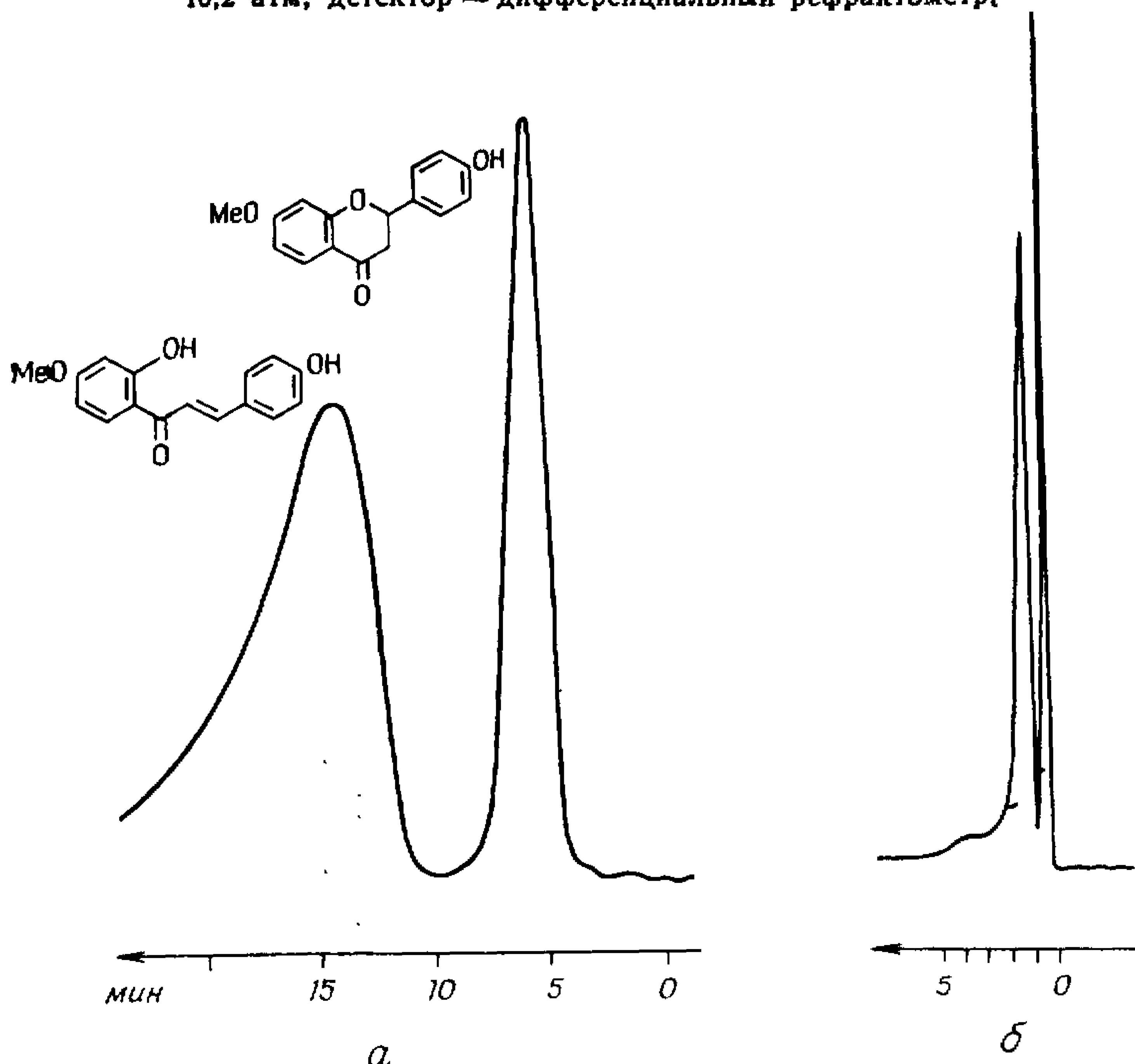


Рис. 4.15. Разделение смеси халькона и флаванона на полиамидах [83].

а) Колонка 45×0,4 см; сорбент — полиамид; элюент — метанол; скорость потока 1 мл/мин; давление 47,6 атм.

б) Колонка 45×0,4 см; сорбент — пеллидон; элюент — метанол — вода (3 : 1); скорость потока 2,5 мл/мин; давление 12,2 атм. В обоих случаях детектор — дифференциальный рефрактометр.

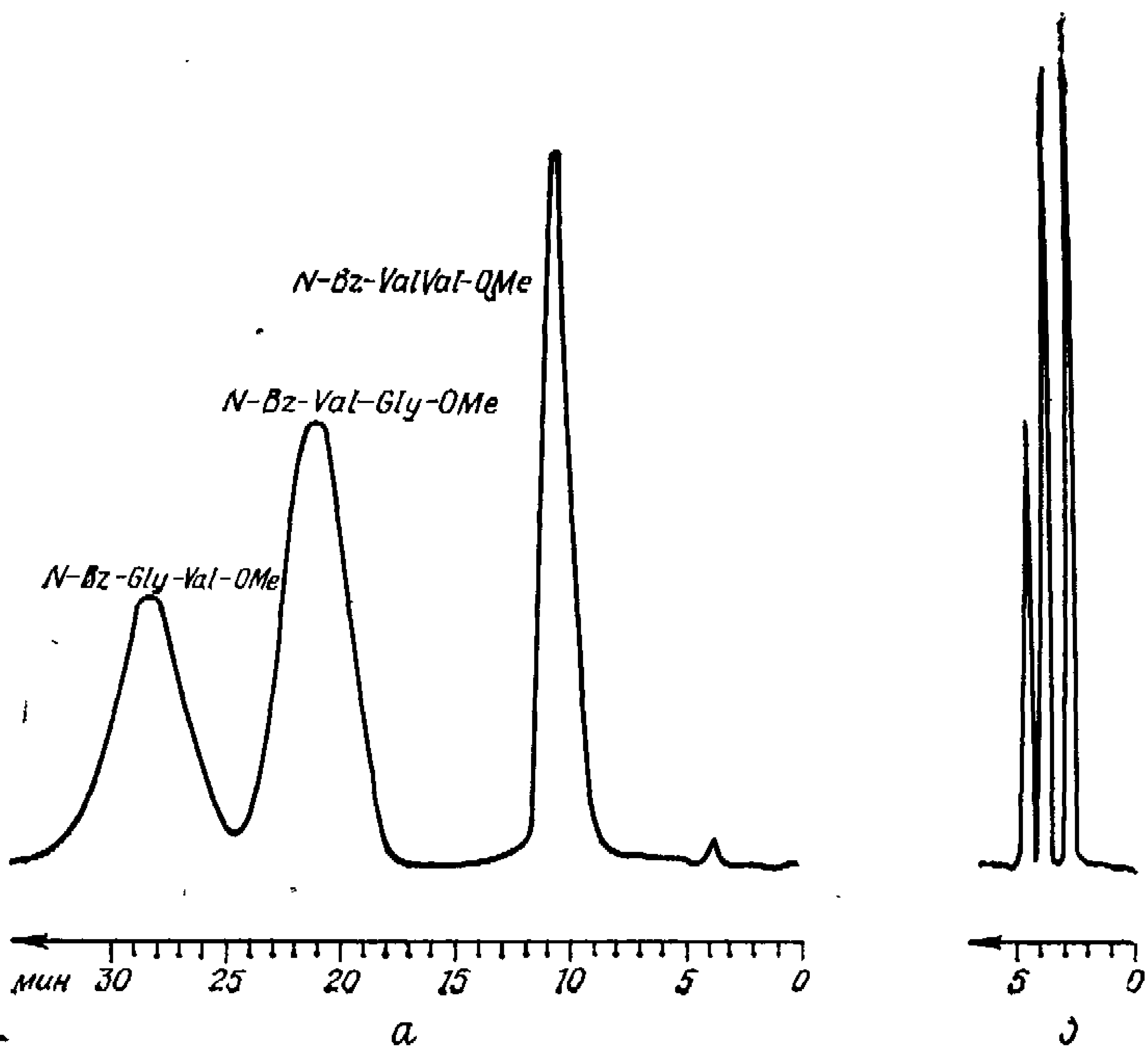


Рис. 4.16. Разделение смеси производных дипептидов [83].

а) Колонка 45×0,4 см; сорбент — меркосорб S160; элюент — метиленхлорид — метанол (99 : 1); скорость потока 1,25 мл/мин; давление 27,2 атм.

б) Колонка 100×0,4 см; сорбент — пеллосил НС; элюент — метиленхлорид — метанол (99 : 1); скорость потока 2,5 мл/мин; давление 23,8 атм.

В обоих случаях детектор — дифференциальный рефрактометр.

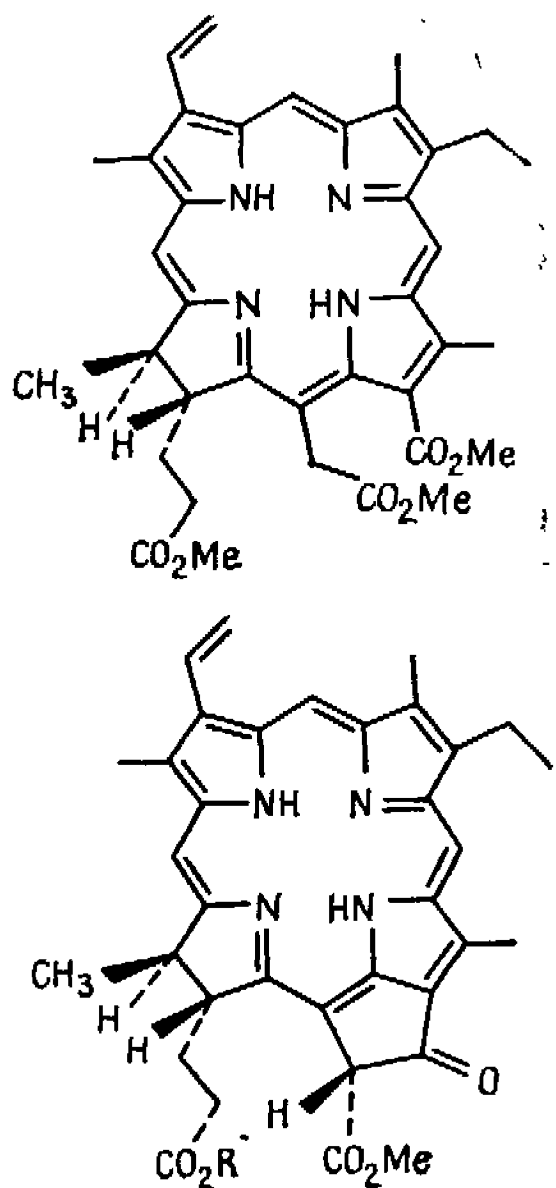


Рис. 4.17. Разделение производных порфирина [83].

Колонка 100×0,4 см; сорбент — пеллосил НС; элюент — метиленхлорид; скорость потока 2,5 мл/мин; давление 17,7 атм; детектор — дифференциальный рефрактометр.

Состав анализируемой пробы: *1* — триметиловый эфир хлорина e_6; *2* — феофитин a (*R* — фитил); *3* — метилфеофорбид a (*R* — метил).

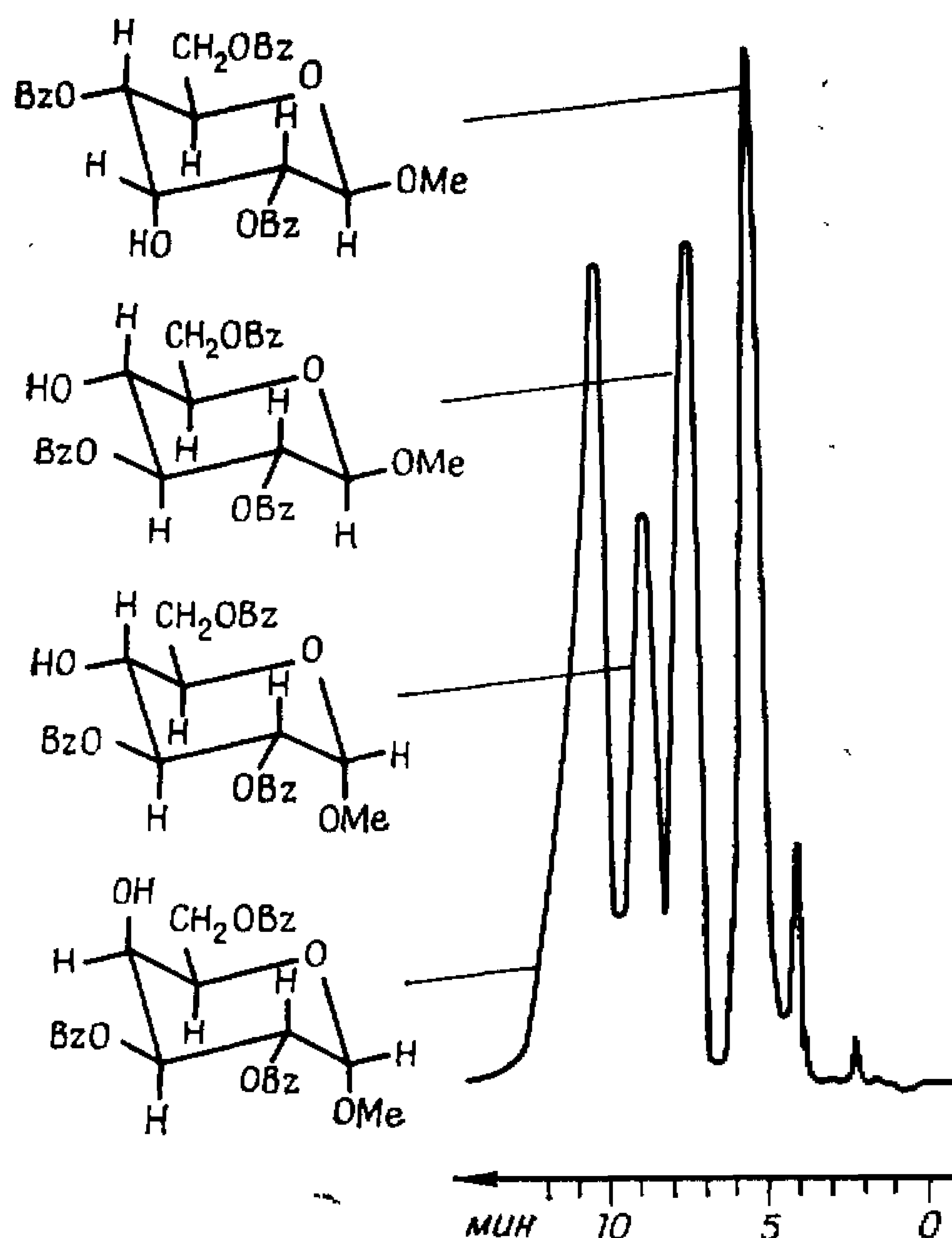


Рис. 4.18. Разделение трибензоатов различных метилгликозидов [83].

Состав анализируемой пробы: колонка 100×0,4 см; сорбент — пеллосил НС; элюент — метиленхлорид; скорость потока 2,5 мл/мин; давление 13,6 атм; детектор — дифференциальный рефрактометр.

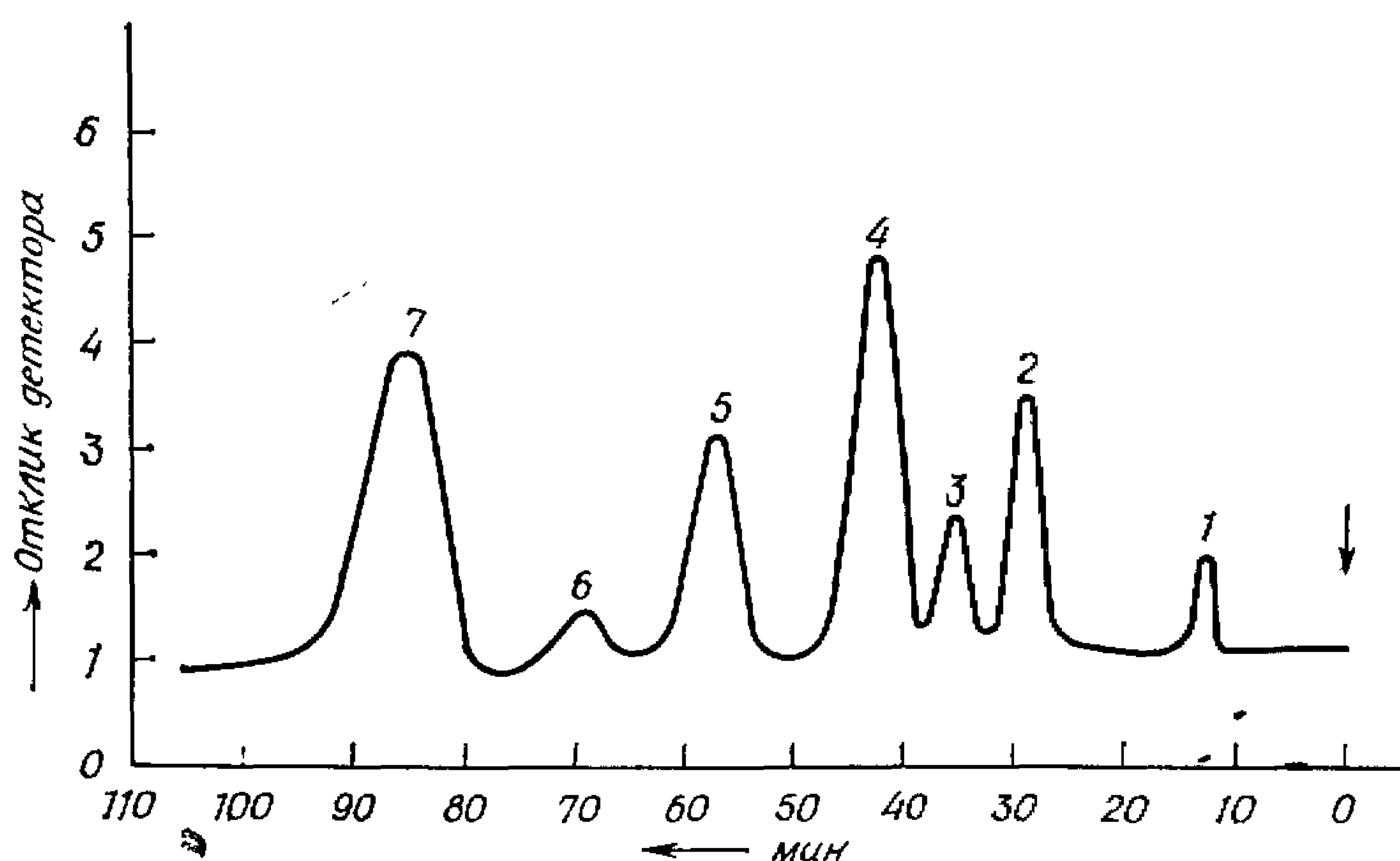


Рис. 4.19. Разделение смеси кортикостероидов [14].

Стеклянная колонка 300×2 мм (внутр. диам.); адсорбент — силикагель, размер частиц 0,04 меш; масса пробы 278 мкг; линейное градиентное элюирование смесью хлороформ (основной компонент) — метанол; скорость потока 1 мл/мин; давление 34—40,8 атм; УФ-детектор (240 нм).

Состав анализируемой пробы: *1* — 11-дезоксикортикостерон; *2* — 11-дегидрокортикостерон; *3* — 11-дезоксикортизол; *4* — кортикостерон; *5* — кортизон; *6* — альдостерон; *7* — кортизол.

Рис. 4.16 иллюстрирует применение адсорбционной хроматографии для разделения смеси ацетатов трех дипептидов на полностью пористом силикагеле (рис. 4.16, *а*) и поверхностно-пористом силикагеле (рис. 4.16, *б*). На рис. 4.17 показана хроматограмма смеси трех производных порфирина, полученная на поверхностно-пористом силикагеле. Два недостаточно разрешенных пика, соответствующих метиловому эфиру феофорбида-α, по-видимому, принадлежат двум эпимерам, отличающимся по конфигурации относительно единичного асимметрического центра. Уорд и Пелтер [83] разделили также смесь трибензоатов метилгликозидов — производных D-глюкозы, D-галактозы и D-аллозы — и добились четкого разделения α- и β-аномеров 2,3,6-трибензоата D-глюкопиранозида, различающихся по конфигурации относительно единичного асимметрического центра (рис. 4.18).

Стероидные соединения различной полярности можно хроматографировать методом ЖТХ при различных условиях. Этому вопросу посвящен ряд критических обзоров, например [56, 78]. Кавина и др. [14] изучали условия хроматографического разделения смесей кортикостероидов, полученные ими результаты показаны на рис. 4.19.

4.5.7. ПРЕПАРАТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ВЫСОКОГО ДАВЛЕНИЯ

В настоящее время ЖХВД используется главным образом в аналитических целях. Как препаративный метод ее можно использовать только для получения малых количеств соединений, в интервале от нескольких миллиграммов до нескольких сотен миллиграммов. Однако опубликованы данные, показывающие, что во многих случаях, увеличивая внутренний диаметр колонки, удается получить отличное разделение, иногда даже лучшее, чем в колонках малого диаметра. Объясняется это тем, что колонки с большим внутренним диаметром можно заполнить более равномерно, кроме того, существует так называемый «эффект бесконечного диаметра» [41], когда раствор пробы не контактирует со стенками колонки, так что в результате скорость его не меняется.

Годбилл и Дево [28] провели разделение методом адсорбционной хроматографии высокого давления ряда образцов на колонке размером 7×100 см и показали, что в этих условиях возможно разделение от десяти до нескольких сотен граммов смеси. Самое главное при таком разделении отработать методику обнаружения: применявшийся авторами УФ-детектор в большинстве случаев находился в режиме насыщения, и элюи-

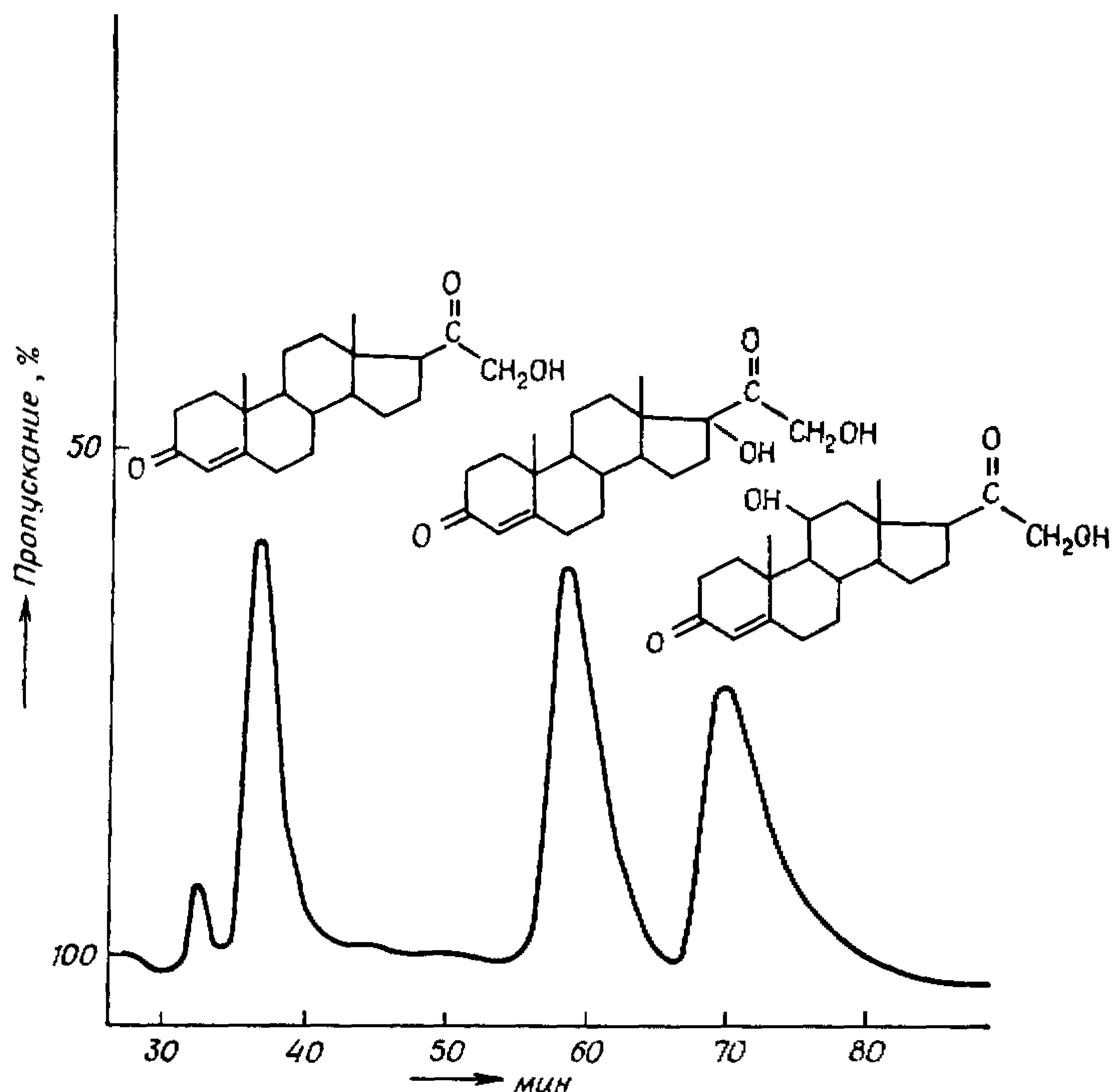


Рис. 4.20. Препаративное разделение специально приготовленной смеси трех кортикостероидов методом ЖХВД [28].

Колонка 100Х8 см; адсорбент — силикагель Н, тип 60 (фирма Merck), размер частиц 20—50 мкм; масса пробы 200 мг дезоксикортикостерона; элюент — метиленхлорид — метанол (90 : 10); скорость потока 60 мл/мин; давление 10,5 атм; УФ-детектор (254 нм).

рованные фракции они анализировали методом ТСХ. На рис. 4.20 показан пример разделения искусственной смеси трех кортикостероидов.

4.5.8. ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ВЫСОКОГО ДАВЛЕНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХИМИЧЕСКИ СВЯЗАННЫХ НЕПОДВИЖНЫХ ФАЗ

Применению распределительной хроматографии (ЖЖХ) под высоким давлением больше всего препятствуют растворимость неподвижной фазы в элюенте и ее постепенное просачивание из колонки, вызывающие дрейф нулевой линии, изменение разделяющей способности колонки и т. д. Избежать этих трудностей пытались различными способами, однако без особого успеха. Предотвратить вымывание неподвижной фазы пытались, в частности, следующим способом: перед основной ко-

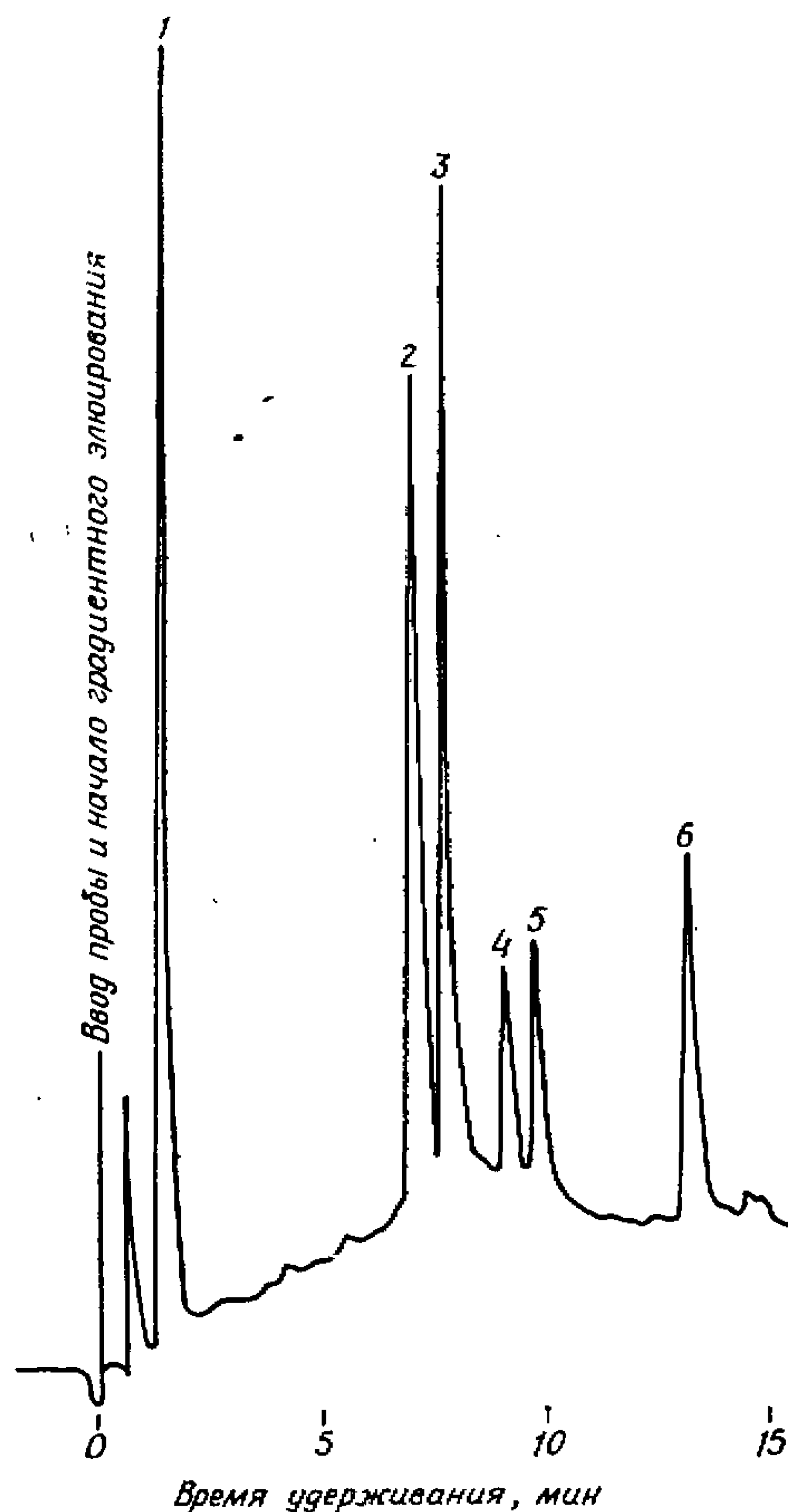


Рис. 4.21. Разделение смеси жирорастворимых витаминов [84].

Колонка 1 м×2,1 мм (внутр. диам.); температура 70 °С; адсорбент — ODS-пермафаза; градиентное элюирование смесью вода (основной компонент) — метанол (5%/мин); скорость потока 2 мл/мин; давление 81,6 атм.
Состав анализируемой пробы: 1 — витамин K, 2 — ацетат витамина A, 3 — витамин D_2, 4 — витамин E, 5 — ацетат витамина E, 6 — витамин A.

лонкой помещали дополнительную колонку, в которой элюент насыщался неподвижной фазой до того, как он поступал в основную разделительную колонку. Однако по-настоящему преодолеть эти трудности удалось лишь в последние годы, когда в качестве насадки стали использовать химически связанные неподвижные фазы. Химически связанные фазы не экстрагируются элюентом, многие из них термостойки и не гидролизуются в условиях хроматографического разделения. Выше, в табл. 4.7, указаны некоторые важные сорбенты этого типа.

Уилльямс и др. [84] разделяли жирорастворимые витамины A, D_2, E и K на сорбенте ODS-пермафаза, применяя градиентное элюирование смесями метанола и воды. Результаты разделения показаны на рис. 4.21.

Разделение эстрогенов рассматривается в работе Баттерфилда и др. [12] (рис. 4.22).

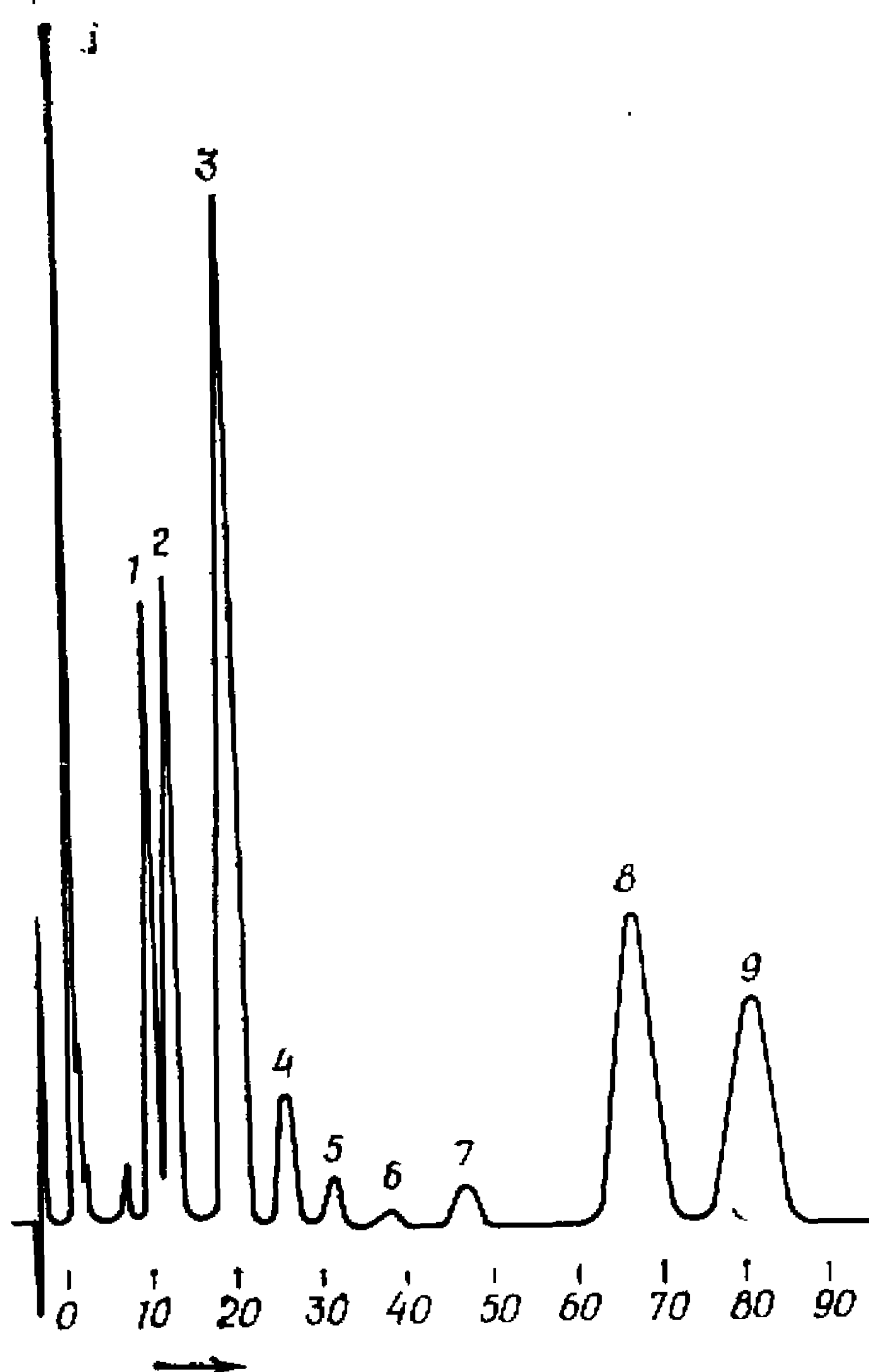


Рис. 4.22. Разделение смеси эстрогенов [12].

Колонка 3 м×1,8 мм (внутр. диам.); температура 40 °С; адсорбент — ETH-пермафаза; элюент — тетрагидрофуран (2%) — *н*-гексан; скорость потока 2 мл/мин; давление 163,2 атм; УФ-детектор (254 нм).

Состав анализируемой пробы: *1* — эстрон, *2* — эквилин, *3* — эквиленин, *4* — α-эстрадиол, *5* — β-эстрадиол, *6* — α-дигидроэквилин, *7* — β-дигидроэквилин, *8* — α-дигидроэквиленин, *9* — β-дигидроэквиленин.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Andersen N. H., Syrdal D. D.*, Phytochemistry, 9, 1325 (1970).
2. Amberlite-XAD, Macroreticular Adsorbent, Rohm and Haas Co., Philadelphia, 1971.
3. *Aquila S., Boix J., Bonet J. J., Rocamora A., Ruiz J. L.*, Afinidad, 27, 715 (1970); Chem. Abstr., 75, 20751x (1971).
4. *Bark L. S., Graham L. J. T.*, J. Chromatogr., 27, 109 (1967).
5. *Bark L. S., Graham L. J. T.*, J. Chromatogr., 27, 116 (1967).
6. *Bark L. S., Graham L. J. T.*, J. Chromatogr., 27, 131 (1967).
7. *Bark L. S., Graham L. J. T.*, Proc. 4th Intern. Symposium Chromatography and Electrophoresis, Presses Académiques Européennes S. C., Bruxelles, 1968, p. 105.
8. *Boken J. M., Joullie M. M., Kaplan F. A., Loev B.*, J. Chem. Educ., 50, 367 (1973).
9. *Bomhoff G. H.*, Tijdschr. Chem. Instrum., 407 (1968).
10. *Bonet-Sugranes J. J., Vilardell Valles L.*, Afinidad, 25, 121 (1968); Chem. Abstr., 69, 59480j (1968).
11. *Brockmann H., Schodder H.*, Chem. Ber., 74, 73 (1941).
12. *Butterfield A. G., Lodge B. A., Pound N. J.*, J. Chromatogr., Sci., 11, 401 (1973).
13. *Carelli V., Liquori A. M., Mele A.*, Nature, 176, 70 (1955).
14. *Cavina G., Moretti G., Cantafora A.*, J. Chromatogr., 80, 89 (1973).
15. *Chi Hong Chu, Pietrzik D. J.*, Anal. Chem., 46, 330 (1970).
16. *Copius-Peereboom J. W.*, in «Stationary Phase in Paper and Thin-Layer

Chromatography» (K. Macek, I. M. Hais, Eds.), Publ. House Czech. Acad. Sci., Prague, 1965, p. 134.
17. *Copius-Peereboom J. W., Beekes H. W.*, J. Chromatogr., **20**, 43 (1965).
18. *De Stefano J. J., Beachell H. S.*, J. Chromatogr. Sci., **8**, 434 (1970).
19. Жидкостная колоночная хроматография. Пер. с англ./Под ред. З. Дейла, К. Мацека, Я. Янака. — М.: Мир, 1978.
20. *Djerassi C., Rittel W.*, J. Am. Chem. Soc., **79**, 3528 (1957).
21. *Egger K., Kleining H.*, Z. Anal. Chem., **211**, 187 (1965).
22. *Endres H.*, Z. Anal. Chem., **181**, 331 (1961).
23. *Endres H.*, in «Stationary Phase in Paper and Thin-Layer Chromatography», (K. Macek, I. M. Hais, Eds.), Elsevier, Amsterdam, 1965, p. 134.
24. *Endres H., Hörmann H.*, Angew. Chem., **75**, 288 (1963).
25. *Engelhardt H., Wiedemann J.*, Anal. Chem., **45**, 1641 (1973).
26. *Gattermann L., Wieland T.*, Die Praxis des organischen Chemikers, 26th Ed., Walter de Gruyter, Berlin, 1939, p. 301.
27. *Gilpin R. K., Burke M. F.*, Anal. Chem., **45**, 1383 (1973).
28. *Godbille E., Devaux P.*, J. Chromatogr., Sci., **12**, 564 (1974).
29. *Grau W., Endres H.*, J. Chromatogr., **17**, 585 (1965).
30. *Grieser M. D., Pietrzyk D. J.*, Anal. Chem., **45**, 1348 (1973).
31. *Halpaar H.*, Kontakte (Merck-Darmstadt), (1973) (2), 13.
32. *Heřmánek S., Schwarz V., Čekan Z.* Collection Czech. Chem. Commun., **26**, 3170 (1961).
33. *Hernandez R., Hernandez R., Jr., Axelrod L. R.*, Anal. Chem., **33**, 370 (1961).
34. *Hörhammer L.*, in «Methods in Polyphenol Chemistry», (J. B. Pridham, Ed.), Pergamon, New York, 1964, p. 89.
35. *Hörhammer L., Wagner H., Macek K.*, Chromatogr. Rev., **9**, 103 (1967).
36. *Houx N. W. H., Voerman S., Jongen W. M. F.*, J. Chromatogr., **96**, 25 (1974).
37. *Ito M., Wakamatsu S., Abe K.*, Kitami Kogyo Tauki Daigaku, Kenkyu Hokoku, **2**, 205 (1968); Chem. Abstr., **70**, 100224q (1969).
38. *Kirkland J. J.*, J. Chromatogr., **83**, 149 (1973).
38a. *Kirkland J. J.*, Chromatographia, **8**, 661 (1975).
39. *Kiselev A. V.*, Advanc. Chromatogr., **4**, 113 (1967).
40. *Kleining H., Reichenbach H.*, J. Chromatogr., **68**, 270 (1972).
41. *Knox J. H., Parker J. F.*, Anal. Chem., **41**, 1599 (1969).
42. *Lawrence B. M., Hogg J. W., Terhune S. J.*, Perfum. Essent. Oil Rec., **60**, 88 (1969).
43. *Lederer E.*, J. Chromatogr., **73**, 361 (1972).
44. *Lehmann G., Hahn H. G., Seiffert-Eistert B.*, J. Chromatogr., 37, 422 (1968).
45. *Leitch R. E., De Stefano J. J.*, J. Chromatogr. Sci., **11**, 105 (1973).
45a. *Liteanu C., Gocan S.*, Gradient Liquid Chromatography Horwood. Chichester, 1974.
46. *Locke D. C.*, J. Chromatogr. Sci., **11**, 120 (1973).
46a. *Majors R. E.*, Intern. Lab., **6**, Nov/Dec, 11 (1975).
47. *Mitchell S. A.*, Chem. Ind. (London), 1966, 924.
48. *Morris L. J., Nichols B. W.*, in «Chromatography» (E. Heftmann, Ed.), 2nd Ed. Reinhold, New York, 1967, pp. 485, 495.
49. *Motl O.*, in «Liquid Column Chromatography» (Z. Deyl, K. Macek, J. Janák, Eds.), Elsevier, Amsterdam, 1975, p. 623.
50. *Motl O., Novotný L.*, in «Laboratory Handbook of Chromatographic Methods» O. Mikeš, Ed.), Van Nostrand, London, 1966, p. 195.
51. *Nicolaides N.*, J. Chromatogr. Sci., **8**, 717 (1970).
52. *Novotný L., Kotva K.*, Collection Czech. Chem. Commun., **39**, 2949 (1974).
53. *Novotný L., Krojidlo M., Samek Z., Kohoutová J., Šorm F.*, Collection Czech. Chem. Commun., **38**, 739 (1973).

54. *Pitra J., Štěrba J.*, Chem. Listy, **56**, 544 (1962).
55. *Pitra J., Štěrba J.*. Chem. Listy, **57**, 389 (1963).
56. *Procházka Z.*, in «Liquid Column Chromatography» (Z. Deyl, K. Macek, J. Janák, Eds.), Elsevier, Amsterdam, 1975, p. 593.
57. *Pryde A.*, J. Chromatogr. Sci., **12**, 486 (1974).
58. *Sakodynski K.*, J. Chromatogr., **73**, 303 (1972).
59. *Saunders D. L.*, Anal. Chem., **46**, 470 (1974).
60. *Schramm G., Braunitzer G.*, Z. Naturforsch, **5b**, 297 (1950).
61. *Seebald H. J., Schunack W.*, Arch. Pharm., **305**, 406 (1972).
62. *Seebald H. J., Schunack W.*, Arch. Pharm., **305**, 785 (1972).
63. *Seebald H. J., Schunack W.*, Arch. Pharm., **306**, 393 (1973).
64. *Seebald H. J., Schunack W.*, J. Chromatogr., **74**, 129 (1972).
65. *Snyder L. R.*, J. Chromatogr., **11**, 195 (1963).
66. *Snyder L. R.*, J. Chromatogr., **12**, 488 (1963).
67. *Snyder L. R.*, Chromatogr. Rev., **7**, 1 (1965).
68. *Snyder L. R.*, J. Chromatogr., **28**, 300 (1967).
69. *Snyder L. R.* J. Chromatogr., **36**, 476 (1968).
69a. *Snyder L. R.*, J. Phys. Chem., **70**, 3941 (1966).
70. *Snyder L. R.*, Principles of Adsorption Chromatography Dekker, New York, 1968.
71. *Snyder L. R.*, in «Modern Practice of Liquid Chromatography» (J. J. Kirkland, Ed.), Wiley-Interscience, New York, 1971, p. 205.
71a. *Snyder L. R., Kirkland J. J.*, Introduction to Modern Liquid Chromatography, Wiley-Interscience, New York, 1974, p. 187.
72. *Snyder L. R., Saunders D. L.*, J. Chromatogr. Sci., **7**, 195 (1969).
73. *Stefanski A.*, Deriving and Reporting Chromatography Data with a Microprocessor-Controlled Integrator, Hewlett-Packard J., No 126 (December 1974), No. 4.
74. *Telepchak M. J.*, Chromatographia, **6**, 234 (1973).
75. *Тюкавкина Н. А., Литвиненко В. И., Шостаковский М. Ф.*, Хроматография на полиамидных сорбентах в органической химии, Новосибирск: Наука, 1973.
76. *Unger W., Schick-Kalb J., Krebs K. F.*, J. Chromatogr., **83**, 5 (1973).
77. *Urbánek B., Lachman J.*, Chem. Listy, **66**, 1094 (1972).
78. *Vestergaard P.*, in «Modern Methods of Steroid Analysis», (E. Heftmann, Ed.), Academic Press, New York, 1973. Chapter 1.
79. *Vogelmann J. H., Wagner R. F.*, J. Chromatogr., **76**, 359 (1973).
80. *Vokáč K., Samek Z., Herout V., Šorm F.*, Collection Czech. Chem. Commun., **35**, 1296 (1970).
81. *Wagner H., Hörhammer L., Macek K.*, J. Chromatogr., **31**, 455 (1967).
82. *Wang K. T., Weinstein B.*, in «Progress in Thin-Layer Chromatography and Related Methods», Vol. 3 (A. Niederwieser, Ed.), Ann Arbor Sci. Publ., Ann Arbor, 1972, p. 177.
83. *Ward R. S., Pelter A.*, J. Chromatogr. Sci., **12**, 570 (1974).
84. *Williams R. C., Schmit J. A., Henry R. A.*, J. Chromatogr. Sci., **10**, 494 (1972).
85. *Winstein S., Lucas H. J.*, J. Am. Chem. Soc., **60**, 836 (1938).
86. *Wolf J. P.*, Anal. Chem., 45, 1248 (1973).
87. *Zaika L. L.*, J. Agr. Food Chem., **17**, 893 (1969).
88. *Zaika L. L., Wasserman A. E., Monk C. A., Jr., Salay J.*, J. Food Sci., **33**, 53 (1968).
89. *Zawta B., Hölzel W.*, Pharmazie, **23**, 174 (1968).
90. *Zweig G., Sherma J.*, Anal. Chem., **46**, 73R (1974).

Глава 5. Ионообменная хроматография

О. МИКЕШ, К ШЕБЕСТА

Институт органической химии и биохимии
Чехословацкой Академии наук, Прага

Я. ШТАМБЕРГ

Институт макромолекулярной химии
Чехословацкой Академии наук, Прага

М. ГЕЙТМАНЕК

Институт химической технологии, Прага

5.1. ВВЕДЕНИЕ

5.1.1. ЧТО ТАКОЕ ИОНООБМЕННИКИ?

Ионообменники — это нерастворимые соединения, способные набухать в водных растворах, т. е. поглощать воду в количестве, которое может изменяться от половины массы сухого ионообменника до величины, превышающей массу сухого ионообменника в несколько раз, и высвобождать ионы в процессе электролитической диссоциации. Высвободившиеся ионы могут замещаться на другие присутствующие в растворе ионы, если у последних большее сродство к ионообменнику. Этот процесс, называемый *процессом ионного обмена,* можно описать уравнением (I — ионообменник)



$$\text{I—A} + \text{B} \rightleftharpoons \text{I—B} + \text{A},$$

где А и В — ионы с зарядами одного знака. Процесс обмена ионов обратим, причем его направление определяется в основном концентрациями ионов, а не их сродством к ионообменнику. Несмотря на то что в приведенном выше примере сродство к ионообменнику I у иона В сильнее, его легко заместить на ион А, если концентрация последнего в растворе существенно выше.

Неорганические ионообменники имеют кристаллическую или полумикрокристаллическую структуру различного типа; способные к обмену ионы содержатся в их решетках. Структура органических полимерных ионообменников образована сшитыми полимерными цепями, содержащими нерегулярно расположенные ионогенные группы (рис. 5.1).

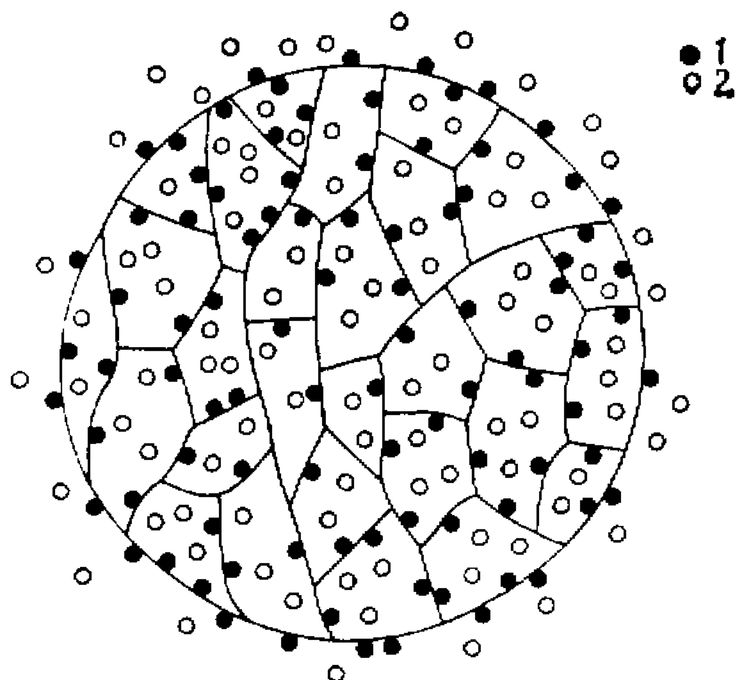


Рис. 5.1. Схематическое изображение структуры частицы органического ионита.

1 — заряженные функциональные группы, ковалентно связанные с нитями решетки; 2 — свободно перемещающиеся противоположно заряженные противоионы, электростатически связанные с частицей; эти противоионы способны претерпевать стехиометрический обмен с другими ионами, обладающими тем же полным зарядом, электронейтральность частицы при этом сохраняется.

5.1.2. КЛАССИФИКАЦИЯ ИОНООБМЕННИКОВ ПО ИХ ПРИРОДЕ И ПО ХИМИЧЕСКОМУ СОСТАВУ МАТРИЦЫ

В соответствии с природой соединений ионообменники делят на две группы: неорганические, например разнообразные минералы, и органические, например синтетические смолы; причем и те и другие могут быть или природными, или синтетическими. В настоящее время часто пользуются ионообменниками, приготовленными в результате той или иной модификации определенных природных материалов, в частности целлюлозы, полидекстрана. В качестве хроматографического материала наиболее важны органические синтетические ионообменники и ионообменники на основе целлюлозы, полидекстрана и агарозы.

5.1.3. КЛАССИФИКАЦИЯ ИОНООБМЕННИКОВ ПО ИОНОГЕННЫМ ГРУППАМ

Ионогенные (обмениваемые) группы определяют функциональные свойства ионообменника, и потому их называют также *функциональными группами*. Функциональные группы, типичные для органических ионообменников, перечислены в табл. 5.1.

Если ионообменник высвобождает и обменивает катионы, то его называют *катионообменником* или катионитом; такие ионообменники представляют собой практически нерастворимые полимерные многоосновные кислоты. Рассмотрим в качестве при-

Таблица 5.1

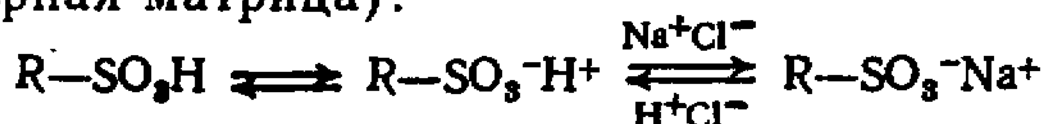
Функциональные группы органических ионитов

Сокращенное обозначение	Формула	Матрица[a]	Тип[б]
	Катиониты		
S	$-SO_3^-$	с.	A_1
SM	$-CH_2SO_3^-$	с.	A_1
SE	$-C_2H_4SO_3^-$	ц., д.	A_1
SP	$-C_3H_6SO_3^-$	д.	A_1
P	$-PO_3^{2-}$	ц., с.	A_2
C	$-COO^-$	г., с.	A_3
CM	$-CH_2COO^-$	ц., д., с.	A_3
	Аниониты		
TAM	$-CH_2\overset{+}{N}(CH_3)_3$	с.	B_1
HEDAM	$-CH_2\overset{+}{N}(CH_3)_2C_2H_4OH$	с.	B_1
TEAE	$-C_2H_4\overset{+}{N}(C_2H_5)_3$	ц.	B_1
QAE	$-C_2H_4N(C_2H_5)_2CH_2CH(OH)CH_3$	д.	B_1
GE	$-C_2H_4NHC(NH_2){=}\overset{+}{N}H_2$	ц.	B_2
MP	$-C_2H_4\overset{+}{N}CH_3$	с.	B_1
DEAE	$-C_2H_4\overset{+}{N}H(C_2H_5)_2$	ц., д.	B_2
ECTEOLA	(неопределенная смесь аминов)	ц.	B_2—B_3
AE	$-C_2H_4\overset{+}{N}H_3$	ц.	B_3
PEI	$-(C_2H_4\overset{+}{N}H_2)_nC_2H_4\overset{+}{N}H_3$	ц.	B_3
AAM	$-\overset{+}{N}HR_2$	с.	B_3
PAБ	$-CH_2C_6H_4\overset{+}{N}H_3$	ц.	B_3

[a] Матрица: с. — смола, ц. — целлюлоза, д. — полидекстран, г. — гидрофильный синтетический гель.

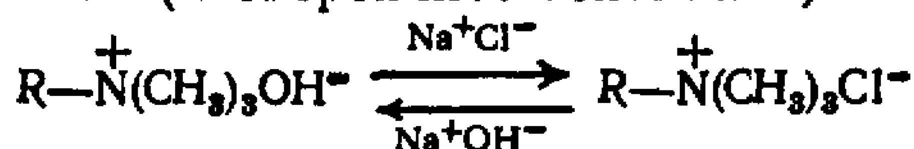
[б] Тип: A_1 — сильнокислотный, A_2 — среднекислотный, A_3 — слабокислотный, B_1 — сильноосновный, B_2 — среднеосновный, B_3 — слабоосновный.

мера сильнокислый сульфокислотный катионит (R — органическая полимерная матрица):



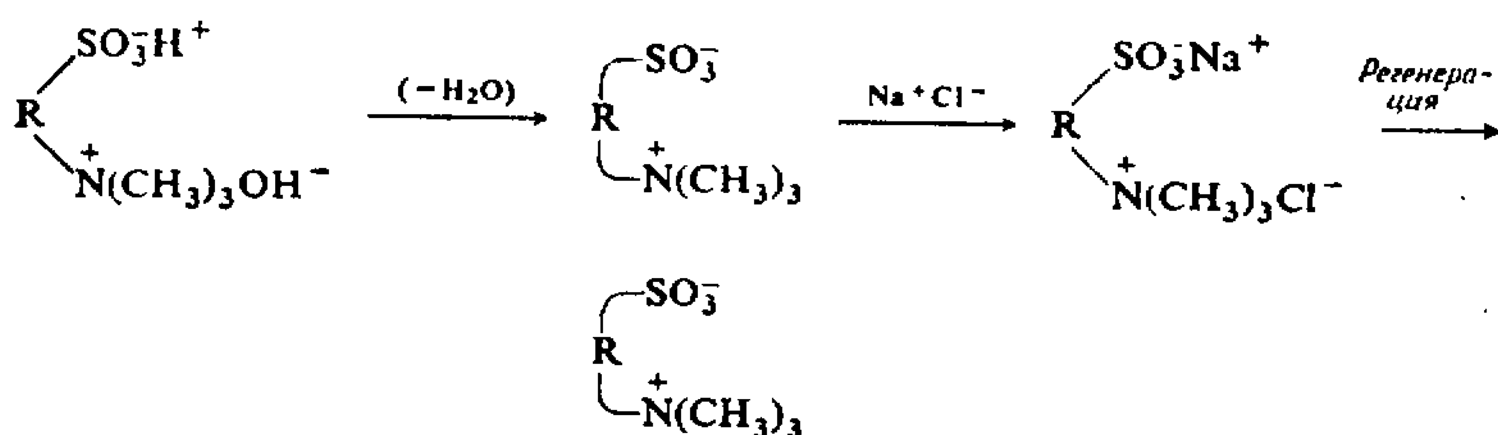
Ионы водорода и натрия, связанные с функциональными группами и способные претерпевать взаимный обмен, называют *противоионами.* Сопутствующие им противоположно заряженные ионы (в данном случае ионы Cl^-) называют *коионами.*

Анионообменники, или *аниониты,* высвобождают и обменивают анионы; аниониты представляют собой практически нерастворимые многоатомные основания. Приведем пример сильноосновного анионита (четвертичное основание):



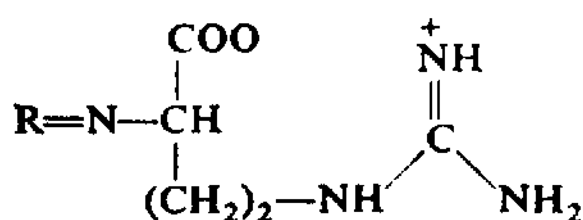
В этом случае противоионами являются ионы OH^- или Cl^-, а коионами — ионы Na^+.

Амфотерные иониты содержат в своей матрице и катионные, и анионные обмениваемые группы. Эти иониты способны образовывать внутренние соли, которые диссоциируют в контакте с электролитами и связывают оба их компонента. Однако эти иониты легко регенерировать, промывая водой. Ниже приведена схема соответствующей реакции.

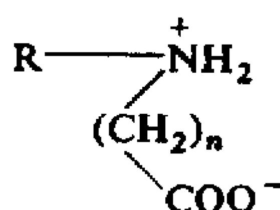


Амфотерные иониты легко привести к равновесному состоянию, промывая буферным раствором. Иониты этого типа не следует путать со смесями частиц катионитов и анионитов, содержащимися в материалах, применяемых для деминерализации в так называемых процессах со смешанным слоем.

Биполярные иониты — особый тип амфотерных ионитов. С матрицей такого ионита (полидекстран, агароза) связаны аминокислоты, которые образуют диполи в водном растворе, например (R — гидрофильная матрица):



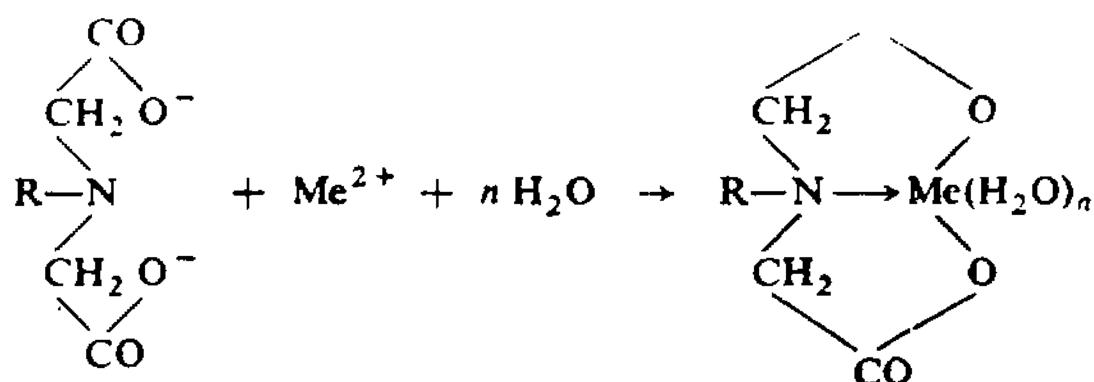
или



(Аргининовый ионит) *(при n = 2, β-аланиновый ионит)*

Иониты этих типов очень удобны для хроматографирования биополимеров, с которыми эти диполи реагируют селективно.

Хелатообразующие иониты содержат функциональные группы, способные к образованию комплексных связей с ионами металлов, например Me^{2+}:



Они преимущественно связывают тяжелые и щелочноземельные металлы. *Селективные иониты* обладают ограниченной связывающей способностью и связывают лишь некоторые ионы. Синтезированы также *иониты специфического действия,* которые содержат специальные функциональные группы и селективно реагируют с ионами лишь одного типа. Однако чаще всего применяются катиониты и аниониты.

5.1.4. КЛАССИФИКАЦИЯ ПО ФОРМЕ И СОСТОЯНИЮ

Большинство ионитов — твердые соединения. К этой группе ионитов относятся твердые или набухающие минералы и органические иониты, образующие после набухания мягкие гели. Применяют и жидкие иониты, но, поскольку они не обладают макромолекулярной структурой, их используют лишь в специальных случаях для проведения экстракций. Жидкие иониты представляют собой низкомолекулярные соединения, в молекулах которых, кроме ионной группы, имеется большая гидрофобная группа. В результате эти иониты растворимы в неполярных растворителях и не смешиваются с водными растворами. Твердые иониты применяют в хроматографии в основном в форме частиц (зерен), получаемых либо дроблением, либо дисперсной полимеризацией; в последнем случае частицы имеют форму шариков (рис. 5.2). Изготавливают иониты и в форме мембран, из них можно также получать трубки, капилляры, волокна и ткани.

В последние годы были получены адсорбенты нового типа, у которых на твердое инертное сферическое ядро нанесен тонкий слой ионита. На этих поверхностно-пористых (пелликулярных) ионитах [81] (рис. 5.3) очень быстро устанавливается равновесие, поскольку диффузия в тонкую ионообменную пленку занимает очень мало времени. В результате ускоряется хро-



Рис. 5.2. Микрофотография зерен ионита, полученных размалыванием более грубых частиц (*а*) и дисперсионной полимеризацией (*б*).

Зерна типа *б* более пригодны для хроматографии. Они в меньшей степени подвержены эрозии и прочнее, слой этих частиц обладает меньшим гидродинамическим сопротивлением. Такие частицы выдерживают большие рабочие давления и высокие скорости потока подвижной фазы.

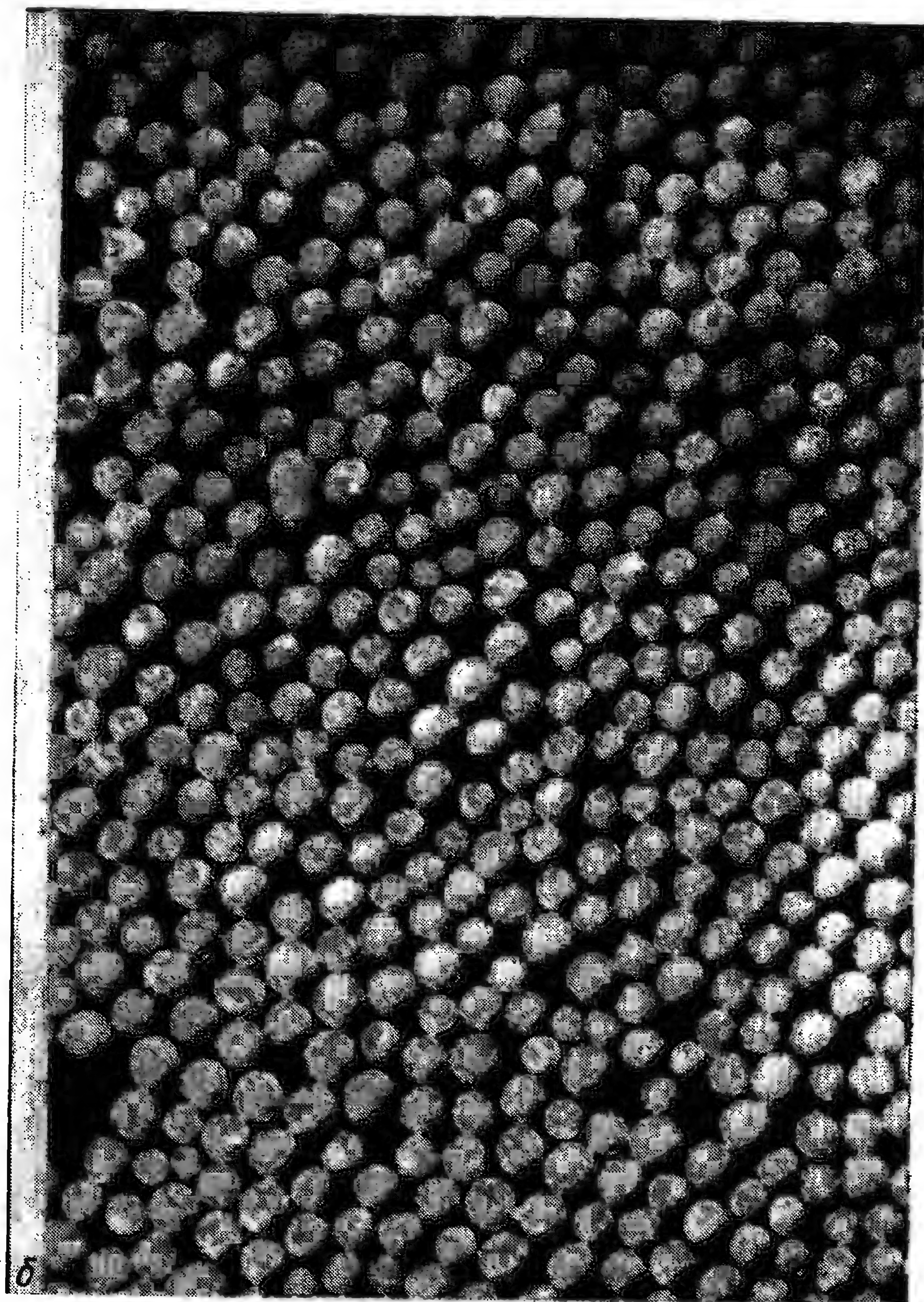


Рис. 5.2. (Продолжение)

матографический процесс. Однако эти адсорбенты обладают относительно малой хроматографической емкостью, так как слой собственно адсорбента очень тонок.

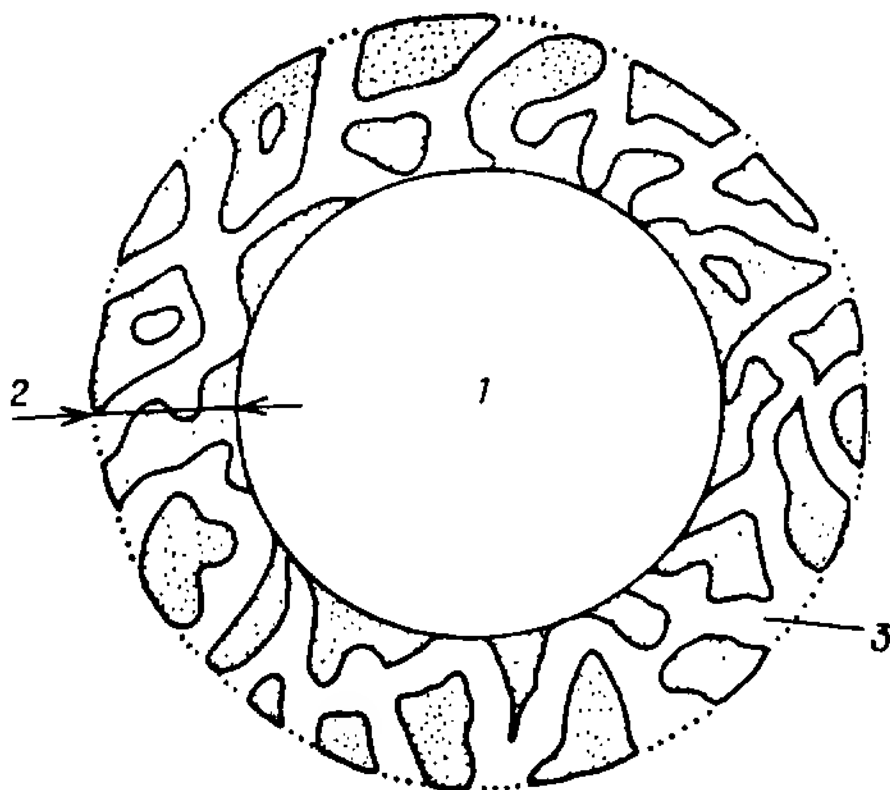


Рис. 5.3. Схема частицы поверхностно-пористого ионита.
1 — инертное ядро, непроницаемое для ионов; 2 — пористый слой, толщина которого очень мала, например, составляет всего 1 мкм; 3 — поры, внутри которых расположены функциональные группы ионообменника.

5.2. СТРУКТУРА ИОНИТОВ

Я. ШТАМБЕРГ

5.2.1. НЕОРГАНИЧЕСКИЕ ИОНИТЫ

Алюмосиликаты — первые соединения, ионообменные свойства которых были описаны в литературе. Уэй [221] и Томпсон [208] вместе со Спенсером (историю вопроса см. в [38]) обнаружили катионообменные свойства у природных глин, а Гэнс [57] разработал принципы получения синтетических алюмосиликатов и описал возможные области их применения в лаборатории и на производстве.

Структурная ячейка алюмосиликатов — тетраэдр MO_4, где M—Si или Al. Если это алюминий, то в решетке один отрицательный заряд остается ненасыщенным, в результате чего и становится возможным связывание катионов. Тетраэдрические ячейки образуют волокнистые, пластинчатые или трехмерные кристаллические структуры. Вначале в качестве ионитов рассматривали лишь соединения с трехмерной структурой, в частности цеолиты (анальцит, морденит, фожазит, шабазит) и фельдшпатоиды (содалит, нозеан, ультрамарин, канкринит) (рис. 5.4). Все такие соединения имеют открытую кристаллическую решетку с порами примерно одинакового размера, до-

ступными для молекул воды и катионов. Диаметр пор составляет примерно 0,22—1,2 нм, причем разброс между максимальным и минимальным размерами невелик: фожазит 0,3 нм, содалит 0,44 нм, синтетическое сито Линде 0,76 нм. Подобная однородность пор позволяет, например, разделить на анальците ионы Rb^+ и Cs^+. На структурно однородных молекулярных си-

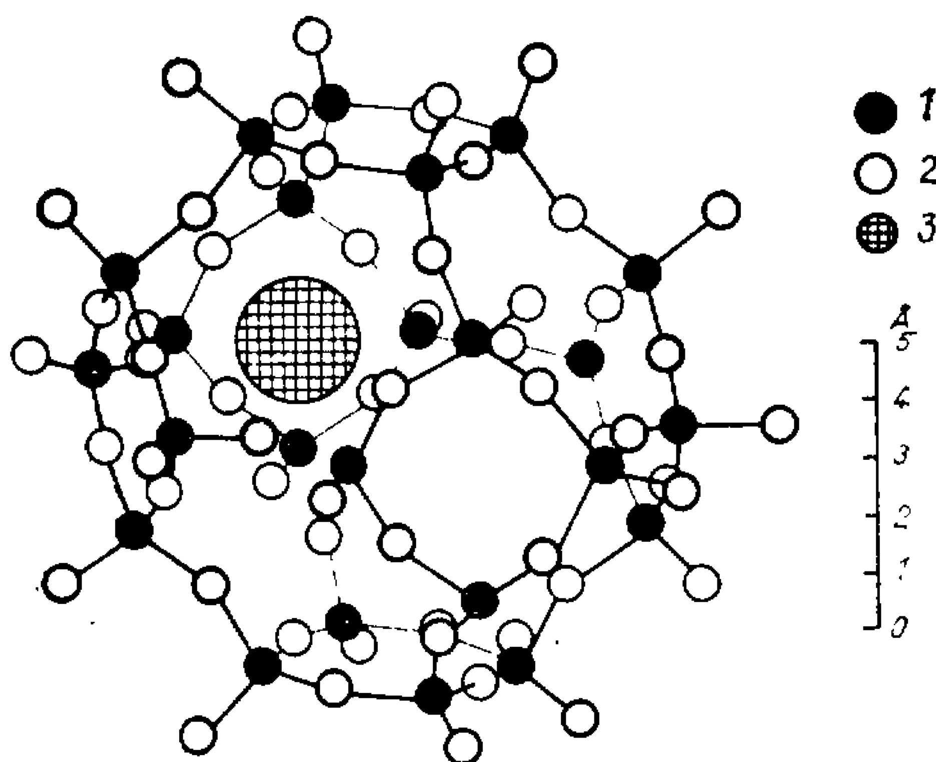


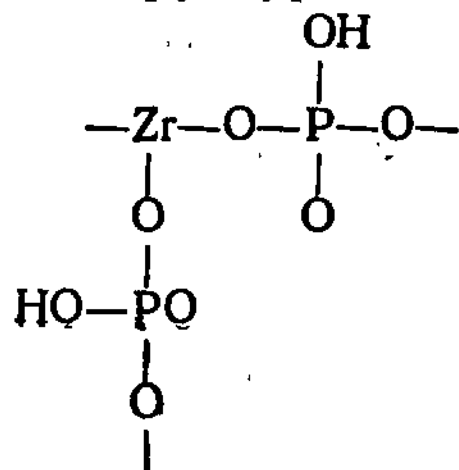
Рис. 5.4. Кристаллическая структура шабазита [141].
1 — Si или Al; *2* — O; *3* — обмениваемый ион.

тах, например ситах типа Линде, можно разделять разветвленные и неразветвленные углеводороды. Как иониты алюмосиликаты имеют серьезные недостатки. Из-за малого размера пор доступ к функциональным группам ограничен даже для небольших по размеру гидратированных катионов, так что скорость диффузии в таком ионите на четыре порядка меньше, чем в воде. Низкая химическая стойкость решетки приводит к тому, что ионит можно использовать лишь в нейтральных средах. По этим причинам алюмосиликаты были вытеснены ионитами на основе синтетических смол.

В послевоенный период интерес к неорганическим ионитам вновь возрос, поскольку велись поиски материалов новых типов, устойчивых к действию радиоактивного излучения и высоких температур и в то же время высокоселективных [4]. Среди аморфных соединений внимание исследователей привлекли гидроксиды Al, Fe, Mn, Th, Si, Sn и Zr. Иониты этого типа имеют неопределенный стехиометрический состав, амфотерны и выдерживают нагревание до 800 °С. Они не слишком селективны, их химическая стойкость и прочность зависят от pH среды и плохо воспроизводятся от партии к партии.

Один из наиболее известных неорганических ионитов — фосфат циркония, структура которого существенно зависит от ус-

ловий его приготовления. Это кристаллический материал состава $Zr(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$, в структуре которого повторяется звено



Таким образом, атомы циркония связаны фосфатными группами, причем половина атомов фосфора находится в плоскостях кристаллической решетки, а половина — в межплоскостных областях. Большинство материалов этого типа характеризуется отношением P/Zr, равным 1,7, и содержит также аморфную фракцию. Емкость и селективность этого ионита зависит от состава фосфата циркония(IV). Фосфат циркония представляет собой среднекислотный катионит, его применяют для разделения продуктов ядерного деления. Основной его недостаток — тенденция к гидролизу, особенно в щелочной среде.

Исследованы ионообменные свойства ряда других нерастворимых соединений: фосфатов, арсенатов, силикатов, оксалатов, сульфидов, хроматов, вольфраматов нескольких поливалентных металлов (Sn, Zr, Bi, Al, Th, Ti и т. п.), солей гетерополикислот (12-молибдофосфатов аммония, молибдоарсенатов и вольфрамофосфатов) и ферроцианидов двухвалентных металлов (Co, Zn, Cu и т. п.). Все описанные выше иониты нашли в лучшем случае очень ограниченное, хотя часто важное применение.

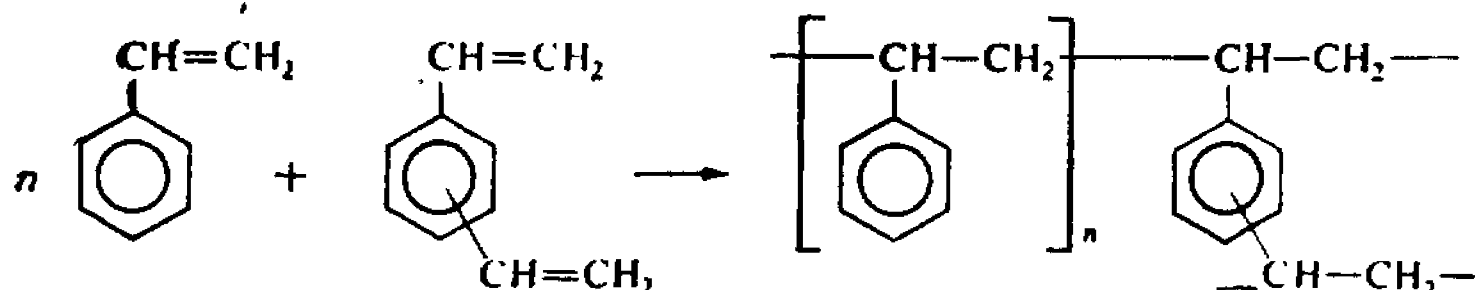
5.2.2. ИОНООБМЕННЫЕ СМОЛЫ

Структура органических полимеров чрезвычайно разнообразна, и в принципе можно синтезировать иониты с самыми различными функциональными группами, различными пористостью и стабильностью [226].

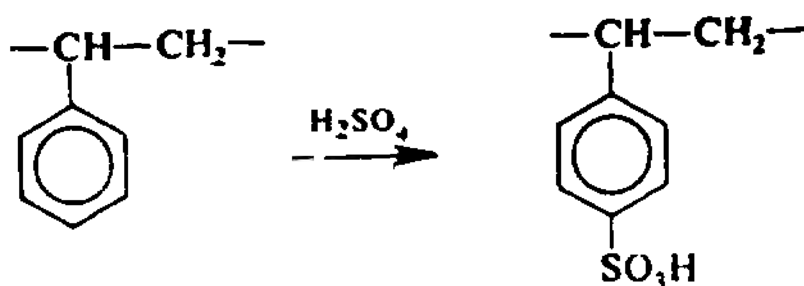
Первые ионообменные смолы получали поликонденсацией фенолов и ароматических аминов с формальдегидом [2]. Позднее конденсацией формальдегида с сульфо-, карбокси-, сульфометил- или аминометилфенолами и ароматическими аминами, модифицированными дицианамидом, или алифатическими аминами, например гуанидином и др., удалось получить иониты других типов. Постепенно метод поликонденсации стал применяться все реже и реже, и в настоящее время выпускают в основном полимерные иониты на основе полистирола и полиакриловых производных. Их легче синтезировать в соответствии с требованиями, т. е. нужной формы, нужного химического соста-

ва и нужной пористости. Кроме того, в большинстве своем они имеют более светлую окраску и характеризуются большей химической стойкостью, чем продукты поликонденсации.

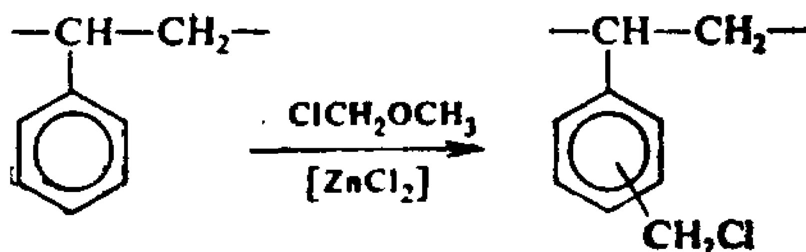
В качестве исходного материала для приготовления полистирольных ионитов применяют шарики сополимеров стирола и дивинилбензола. Такие шарики получают путем дисперсной радикальной сополимеризации стирола с дивинилбензолом (ДВБ) в водной среде, содержащей стабилизатор (крахмал, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон и т. п.):



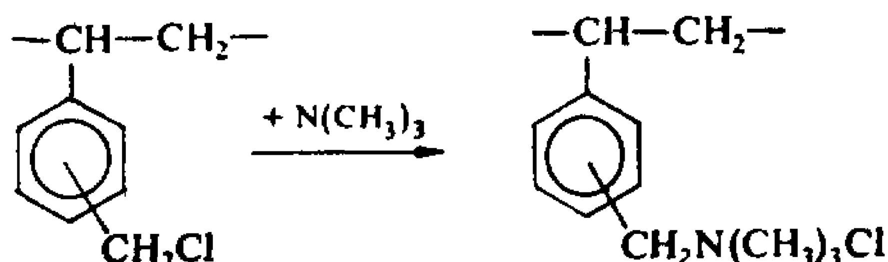
Относительное содержание ДВБ, определяющее степень сшивки скелета ионита, выражают числом массовых процентов ДВБ в мономерной смеси, причем часто это число указывают в названии ионита после буквы X. Например дауэкс 50X8 представляет собой катионит типа дауэкс 50 с относительным содержанием дивинилбензола 8%. При изготовлении сильнокислотных катионитов сополимерам сначала дают набухнуть, например в дихлорэтане, после чего их сульфируют концентрированной серной кислотой при 80—120 °С. Все ароматические кольца могут содержать по одному заместителю в *пара*-положении.



Обычные катиониты на основе стирола приготавливают из полистирола со степенью сшивки 6—10%; иониты специальных типов содержат 1—20% ДВБ или обладают макропористой структурой. Их можно использовать во всем диапазоне pH при температурах до 120 °С, а непродолжительное время и при более высоких температурах. Чтобы получить аниониты, сополимеры стирола и дивинилбензола сначала хлорметилируют, например монохлордиметиловым эфиром с хлоридом цинка в качестве катализатора:

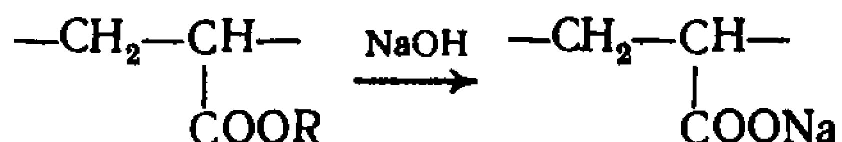


Реакцию ведут в колбе с обратным холодильником; выход продукта высокий, причем в некоторой степени может происходить и дизамещение. Полимерное хлорметильное производное взаимодействует с триметиламином с образованием сильноосновного анионита первого типа:

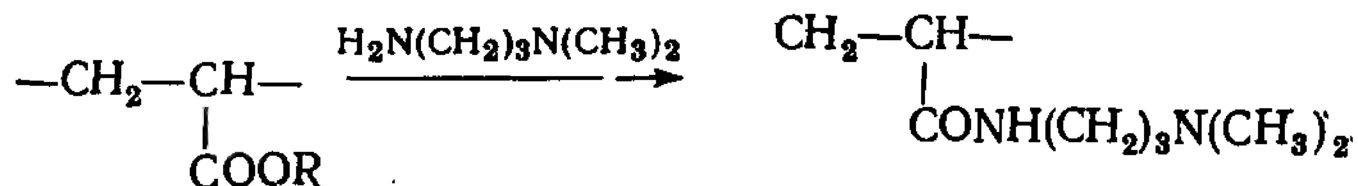


Аналогичным образом диметиламиноэтанол дает анионит второго типа (с пониженной основностью), амины с меньшей степенью замещения дают слабоосновные аниониты. Такого рода обработке можно подвергать сополимер гелеобразной или макропористой структуры с различным содержанием ДВБ. Содержание ДВБ обычно составляет 1—2% и 6—8%. Слабоосновные аниониты устойчивы до температуры 100 °С, сильноосновные аниониты устойчивы лишь в форме солей; свободные основания анионитов первого типа выдерживают нагревание до 60 °С, а аниониты второго типа — лишь до 40 °С. Аниониты на основе стирола можно применять во всем диапазоне pH. На основе сополимеров стирола и дивинилбензола можно синтезировать еще ряд ионитов с фосфониевыми, иминодиацетильными, тиольными и другими функциональными группами.

Для приготовления акриловых ионитов можно использовать сополимеры, не содержащие функциональных групп, например сополимеры акриловых или метакриловых эфиров с дивинилбензолом или с этилендиметакрилатом. Щелочной гидролиз при повышенных температурах (метакриловые эфиры гидролизуют под давлением) дает катионит типа карбоновой кислоты, например:



а аминолиз дает слабоосновный анионит, например:



который в результате алкилирования можно превратить в сильноосновной анионит. Другие методики предусматривают прямую полимеризацию мономеров, уже содержащих функциональные группы, например полимеризацию метакриловой кислоты или аминоалкилметакрилатов с дивинилбензолом. Акриловые

катиониты отличаются высокой емкостью, устойчивостью к действию температур до 100 °С, их можно применять во всем диапазоне pH (в нейтральных и щелочных средах как иониты, в кислой среде как адсорбенты). Аниониты, особенно сильноосновные, могут подвергаться гидролитическому расщеплению, поэтому необходимо выполнять все рекомендации изготовителя.

Относительно недавно в хроматографии начали использовать ионообменные полимеры типа оксиалкилметакрилатного геля с макропористой гидрофильной матрицей (ср. гл. 7, рис. 7.4 и гл. 6, разд. 6.2.4). Эти иониты (карбоксиметильные, фосфо-, сульфо- и диэтиламиноэтильные производные) химически устойчивы, в их поры могут проникать и при этом не претерпевать денатурирования макромолекулярные биополимеры. Поскольку эти иониты достаточно прочны и хорошо проницаемы для жидкостей, их можно применять в жидкостной хроматографии при высоком давлении даже для разделения биополимеров [123а].

5.2.3. ИОНИТЫ НА ОСНОВЕ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

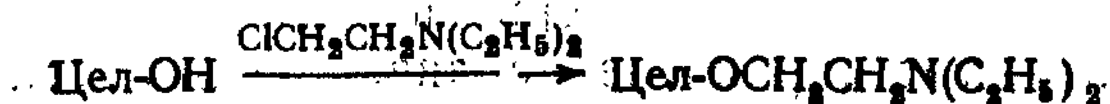
В хроматографии биохимических смесей важную роль играют производные целлюлозы, содержащие способные участвовать в обмене функциональные группы [147]. В отличие от ионитов других типов целлюлозные иониты приготавливают в форме волокон или так называемых микрогранул, т. е. коротких катышков. Относительно недавно удалось получить шарики хроматографической целлюлозы; описана также методика получения в виде сферических частиц производных целлюлозы, применяемых в качестве ионообменников. Целлюлозы этого типа имеют характерную структуру (разд. 5.2.6) с большими порами, проницаемыми даже для биополимеров с молекулярной массой до 10^6, и проявляют сильную гидрофильность, а поэтому они более пригодны для анализа биополимерных систем, чем ионообменные смолы с углеводородным скелетом.

При приготовлении ионообменных целлюлоз основное внимание уделяют их физической структуре и требуемому распределению функциональных групп по объему ионита. В настоящее время синтезируют в основном катиониты со слабокислотными группами (карбоксиметилцеллюлоза, СМ-целлюлоза), используя для этого реакцию целлюлозы (цел-ОН) с хлоруксусной кислотой в щелочной среде:



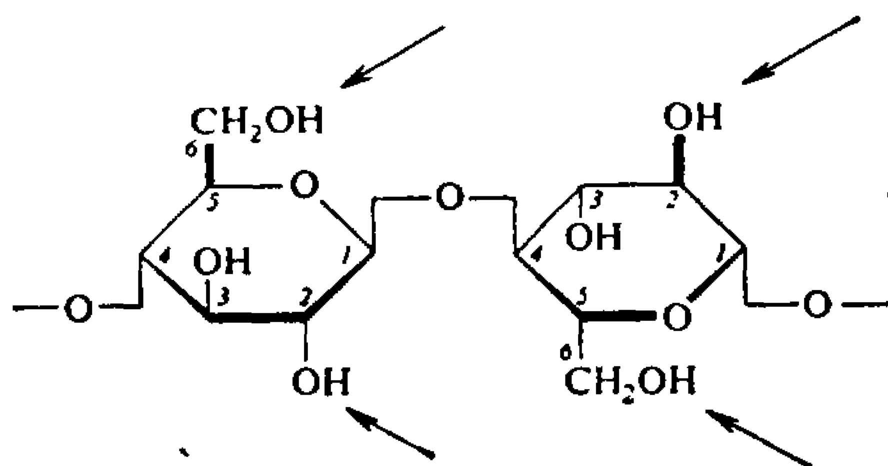
$$\text{Цел-OH} \xrightarrow{ClCH_2COONa} \text{Цел-}OCH_2COONa$$

а также аниониты со среднеосновными группами (диэтиламиноэтилцеллюлоза, DEAE-целлюлоза) с помощью реакции целлюлозы с N,N-диэтиламиноэтилхлоридом в присутствии щелочи:



$$\text{Цел-OH} \xrightarrow{ClCH_2CH_2N(C_2H_5)_2} \text{Цел-}OCH_2CH_2N(C_2H_5)_2$$

В этих реакциях присоединение идет преимущественно в положениях 2 и 6 и частично в положении 3:



Можно синтезировать также ряд других производных целлюлозы, в частности фосфо- и сульфопроизводные, однако в настоящее время эти производные не используются столь широко, как упомянутые выше СМ- и DEAE-целлюлоза.

5.2.4. ИОНИТЫ НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ ПОЛИДЕКСТРАНА И АГАРОЗЫ

В последние годы большую популярность, главным образом в гель-проникающей хроматографии, приобрели гидрофильные гели декстрана (сефадекс) [52] (см. гл. 6). На основе этих гелей приготавливают иониты с карбоксиметильными, диэтиламиноэтильными, сульфоэтильными, сульфопропильными и четвертичными основными группами (СМ-, DEAE-, SE-, SP-, QAE-сефадекс). Получают их с помощью реакций, аналогичных применяемым для приготовления производных целлюлозы.

Декстрановые иониты отличаются от целлюлозных главным образом своей физической структурой. Декстрановые ионы подобны макропористым ионообменным смолам; проявляют свойства пористых материалов после набухания; их так же, как и смолы, приготавливают в форме шариков. Однако поры декстрановых гелей больше по диаметру, и в них могут проникать макромолекулы. Подобно целлюлозным ионитам, эти материалы характеризуются высокой гидрофильностью, что важно при работе с биополимерами.

Совсем недавно в продаже появились ионообменные производные агарозы, сшитые 2,3-дибромпропанолом и десульфированные щелочным гидролизом в восстановительных условиях (см. табл. 5.6 и гл. 6, разд. 6.2.5). У СМ- и DEAE-производных агарозы выше, чем у ионообменных декстранов, предел исключения (мол. масса около 10^6) и больше устойчивость.

5.2.5. ИОНООБМЕННЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДРУГИХ ТИПОВ

Ионный обмен в почве, о котором говорилось в разд. 5.2.1, происходит не только на глинах, но и на гумусовых веществах. Некоторые типы бурых углей использовались для умягчения воды, а до синтеза ионообменных смол сульфированный черный уголь был единственным катионитом, способным функционировать в H^+-форме. Недавно было показано, что биополимерные материалы могут вести себя как эффективные сорбенты, образующие хелатные соединения с ионами металлов. Мицеллы низших грибков, упрочненные синтетическими смолами, применяли для очистки сточных вод [87], а тяжелые металлы разделяли хроматографически на хитине или хитозане [133].

Число описанных в литературе ионообменных структур постоянно растет, и практически невозможно их просто перечислить. Вначале наблюдалась тенденция к приготовлению сильнодиссоциированных и монофункциональных ионитов, но для настоящего времени характерно стремление к получению материалов с разнообразными согласованными наборами функциональных групп. Весьма часто эти материалы уже не являются ионообменниками в прямом смысле слова, а, скорее, представляют собой аналогичные гелевые системы [187], ионообменная активность которых обусловлена разного рода взаимодействиями между растворенными веществами и макромолекулярными носителями функциональных групп. В настоящее время синтезированы олеофильные [213] и обесцвечивающие [190] иониты, иониты селективного действия [71], а также сорбенты карбонильных соединений [176], полимеры окислительно-восстановительного действия [26], полимерные катализаторы для аффинной хроматографии и т. п. Несмотря на разнообразие имеющихся в них функциональных групп, структуры этих материалов в основном довольно похожи.

5.2.6. ФИЗИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ГРАНУЛИРОВАННЫХ ИОНИТОВ

Чаще всего иониты получают в виде зерен неправильной формы диаметром $10—10^{-2}$ мм и в особых случаях в виде правильных сферических частиц такого же размера. Ионообменную фазу можно также получать в виде тонкой пленки и наносить на поверхность сферических частиц (поверхностно-активные иониты). Кроме того, изготавливают иониты с зернами цилиндрической формы, в форме волокон, капиллярных трубок и мембран. Физическая структура частицы ионита (пористость ионообменной фазы) в значительной степени определяет транспорт ионов к обмениваемым функциональным группам. Скелет

ионитов *типа гомогенных гелей* состоит из одной или из нескольких взаимопроникающих сеток. Если ионит синтезирован путем сополимеризации, то образуется «островная» структура, в которой плотно сшитые центры, локализованные в массе ио-

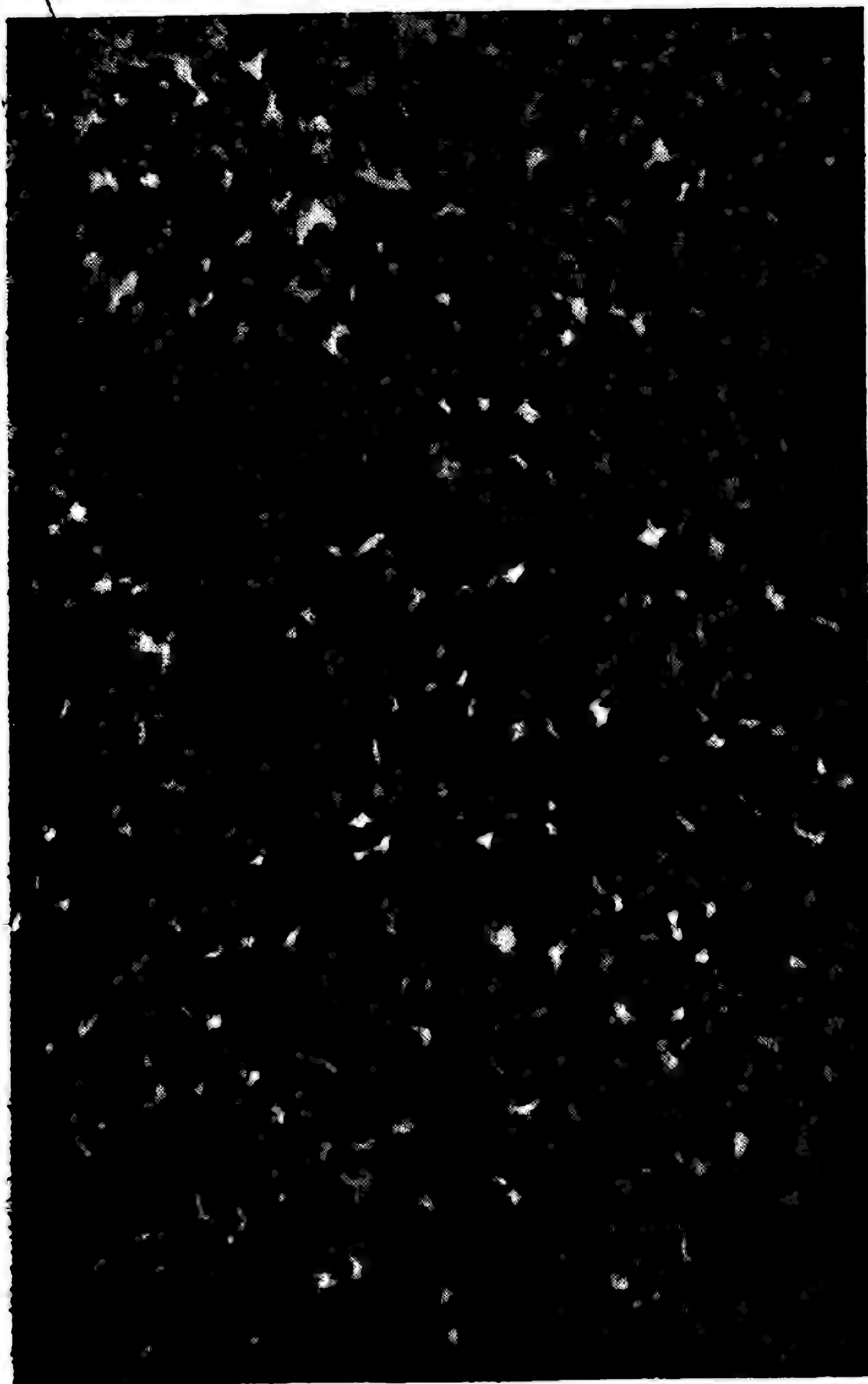


Рис. 5.5. Структура крупнопористого стирольного ионита [108a].

нита, связаны друг с другом менее плотной сеткой. При сшивке уже имеющихся полимерных цепей образующиеся поры распределяются в полимерной сетке более равномерно (равномерно пористые иониты). Однако пока еще не удалось получить полимерную сетку, подобную каркасу алюмосиликата, т. е. с равномерно распределенными одинаково большими порами.

Для обмена с участием ионов большого размера следует применять иониты типа гелей с относительно небольшим числом поперечных связей, однако с уменьшением степени сшитости механическая прочность ионита снижается и в конце концов может оказаться ниже допустимого предела. В подобных случаях лучше пользоваться ионитами гетерогенной структуры с большой внутренней поверхностью, на которой идет процесс сорбции. К таким ионитам относятся *макропористые* (макроретикулярные) ионообменные смолы и иониты на основе целлюлозы. Первые приготавливают путем сополимеризации в присутствии инертного компонента, осаждающего образующийся сополимер. Сверхмикроскопические частицы (10—100 нм) образуют агрегаты с внутренними пустотами (макропорами) примерно одинаковых размеров (рис. 5.5). В целлюлозных ионитах агрегирование полисахаридных цепей обусловлено их ориентацией вдоль оси волокна, что приводит к образованию кристаллических областей.

5.3. ПРИРОДА СОРБЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ

5.3.1. ИОННЫЙ ОБМЕН

Набухший в воде ионит находится в состоянии динамического равновесия со средой. Вода проникает в него из окружающего раствора и уменьшает концентрацию обмениваемых групп и противоионов. Однако, поскольку скелет ионита, т. е. пространственная сшитая структура, нерастворим, процесс растворения достигает лишь стадии ограниченного набухания. В случае органических ионитов с эластичной структурой обе эти тенденции обусловливают появление давления набухания. Если в раствор добавляют новый электролит, то новые и уже присутствующие в системе ионы перераспределяются между этими двумя фазами в соответствии с правилами доннановского равновесия, т. е. в условиях термодинамического равновесия система должна оставаться электронейтральной. Обмен ионами одинакового заряда A и B (индексы *i* и *o* соответствуют иониту и водной фазе) описывается выражением



$$A_i + B_o \rightleftharpoons B_i + A_o. \qquad (5.1)$$

В принципе в такой ситуации для определения константы термодинамического равновесия применимо следующее соотношение:

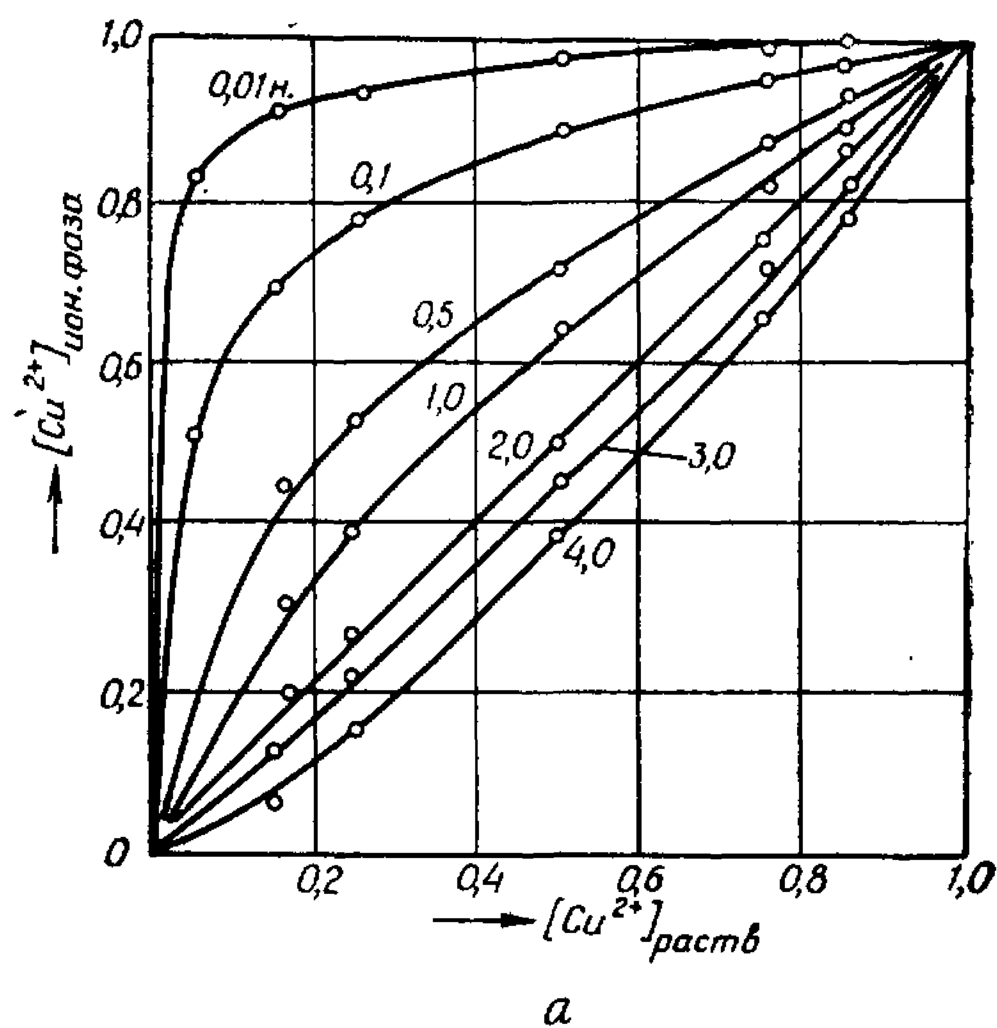
$$K_{td} = ([B_i][A_o]/[A_i][B_o])(\gamma B_i \gamma A_o / \gamma A_i \gamma B_o).$$

Это соотношение имеет ограниченную применимость в силу того, что неизвестны коэффициенты активности γ_i в ионообменной фазе. Как правило, пользуются лишь константой концентрации (коэффициент селективности), величина которой зависит, например, от степени обмена и от ионной силы электролита. Детальную картину селективности обмена дают диаграммы равновесия (см. пример на рис. 5.6). Сродство к иониту обратно пропорционально радиусу гидратированного иона и пропорционально его заряду. Для сильнодиссоциированных ионитов наблюдались следующие ряды селективности: $Ba^{2+} > Pb^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+} > Ni^{2+} > Cd^{2+} > Cu^{2+} > Co^{2+} > Zn^{2+} > Mg^{2+}$; $Tl^{+} > Ag^{+} > Cu^{+} > Rb^{+} > K^{+} > NH_4^{+} > Na^{+} > Li^{+}$; цитрат $> SO_4^{2-} >$ оксалат $> I^{-} > NO_3^{-} > CrO_4^{2-} > Br^{-} > SCN^{-} > Cl^{-} >$ формиат $> F^{-} >$ ацетат.

Скорость ионного обмена регулируется законами диффузии. При этом следует учитывать диффузию в растворе, сквозь пленку жидкости на поверхности частицы и сквозь набухшую ионообменную фазу. Скорость обмена определяется в основном двумя последними стадиями; на сильнодиссоциированных катионитах при концентрациях менее $5 \cdot 10^{-3}$ г-ион/л скорость обмена определяется второй стадией, а при концентрациях выше 0,1 г-ион/л — третьей стадией.

5.3.2. ПРОЦЕССЫ, СОПРОВОЖДАЮЩИЕ ИОННЫЙ ОБМЕН

В предыдущем разделе рассматривалась электростатическая сила притяжения между диссоциированными ионами и функциональными группами ионита. В процессе ионного обмена происходит перераспределение ионов; оно не вызывает образования ковалентных связей, и потому не сопровождается заметным выделением тепла. Однако большинство сорбционных процессов на ионитах сопровождается образованием дополнительных сил связывания. В процессе обмена органическими ионами на органических ионитах возникают дисперсионные взаимодействия между неионизованными остатками, т. е. ионный обмен сопровождается физической адсорбцией. Для слабокислотных и слабоосновных ионитов может наблюдаться вполне отчетливая зависимость селективности от pH, обусловленная образованием ионных пар обмениваемых групп с ионами H^{+} или OH^{-}.



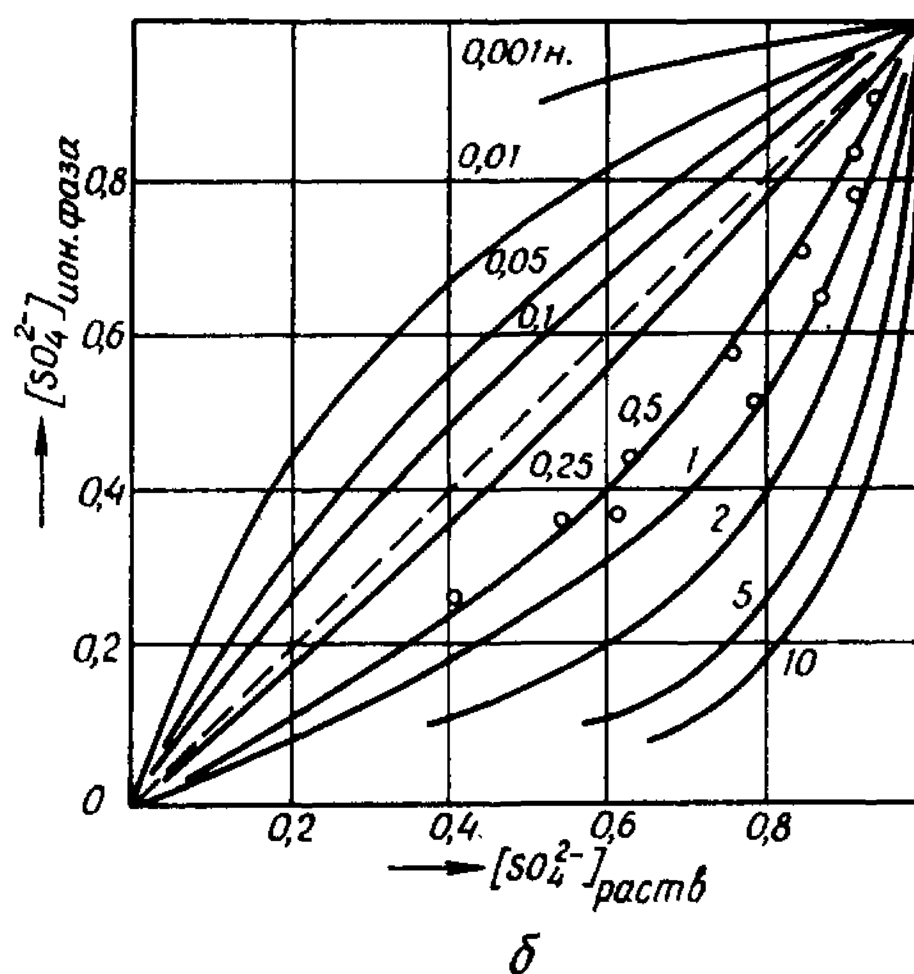


Рис. 5.6. Примеры изотерм обмена катионами (*а*) и анионами (*б*) на диаграммах равновесия.

а — обмен Cu^{2+} — Na^{+} на сульфированном катионите дауэкс 50 при различных концентрациях [194]; *б* — обмен Cl^{-}—SO_4^{2-} на сильноосновном анионите дауэкс 2 при различных концентрациях [225]. На обеих диаграммах даны нормальные концентрации ионов в ионообменной фазе (ордината) и в растворе (абсцисса).

При сорбции многозарядных катионов на фенолсульфоновых, фенолкарбоксильных и карбоксильных катионитах образуются комплексные связи. При этом может полностью измениться природа процесса сорбции. На основных анионитах тяжелые металлы могут образовывать связи с аминогруппами, например могут образовываться хелатные соединения.

Образование водородных связей между гидратной оболочкой катионов и обмениваемой группой приводит к обращению ряда селективности катионов щелочных металлов, полученного на катионитах с карбоксильными или фосфиновыми группами, а для сульфированных катионитов последовательность катионов сохраняется. Отмеченные выше примеры наблюдались как аномалии в поведении ионитов обычных типов. В нескольких случаях эти наблюдения помогли получить сорбенты с заранее заданными свойствами.

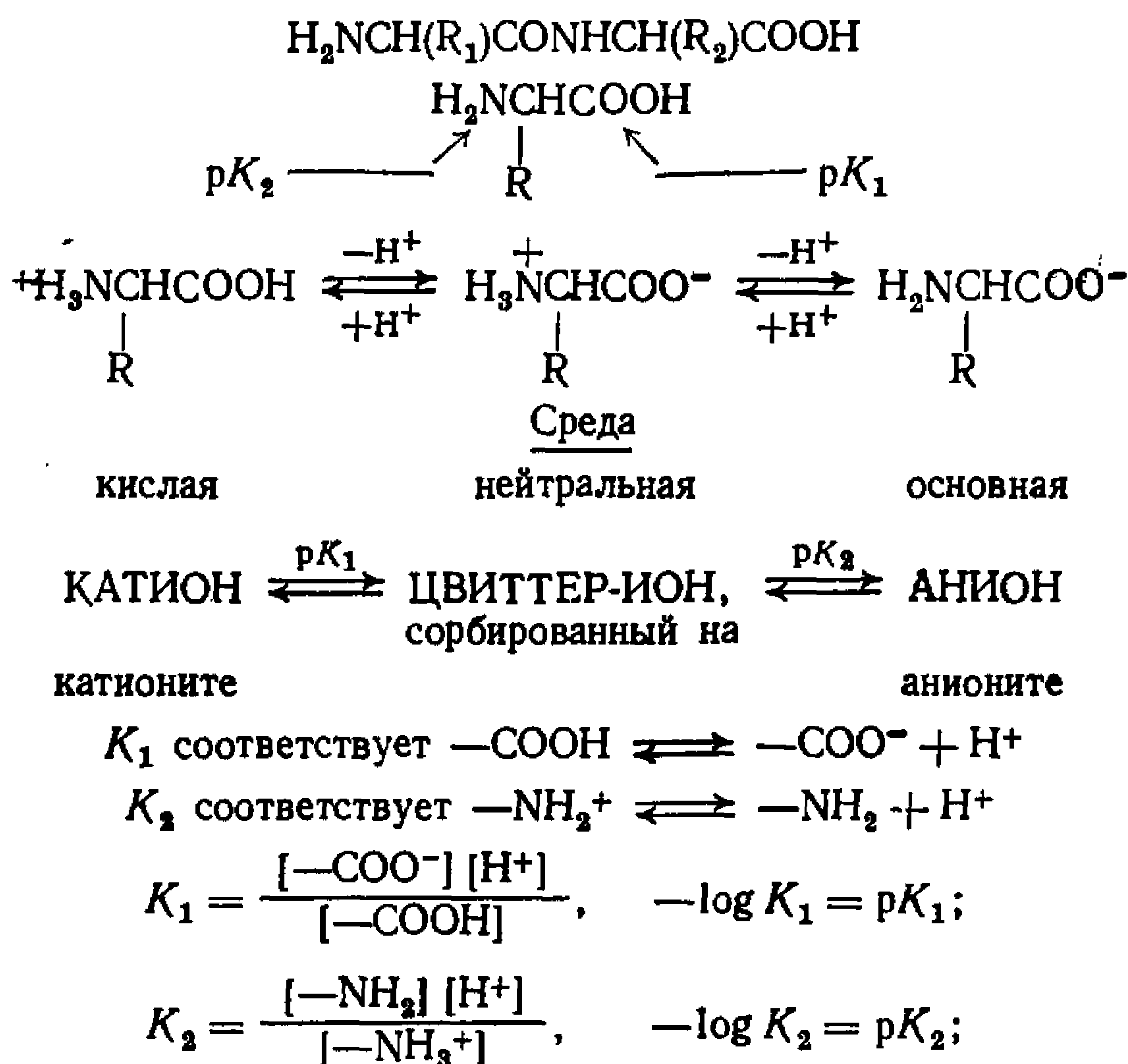
5.3.3. СОРБЦИЯ АМФОТЕРНЫХ ИОНОВ

О. МИКЕШ

Аминокислоты, пептиды и другие амфотерные соединения в диссоциированной форме в водных растворах находятся исключительно в виде амфотерных ионов. Заряд этих ионов может меняться в зависимости от pH среды. Соответствующие соотношения приведены в табл. 5.2. В виде цвиттер-ионов, т. е. ионов с зарядами обоих знаков, аминокислоты существуют только в нейтральной среде. В кислой среде подавляется диссоциация карбоксильной группы и аминокислота ведет себя как катион, а в щелочной среде исключается протонирование с образованием аммониевой группы и цвиттер-ион превращается в анион. Степень диссоциации определяется константами диссоциации pK_1 и pK_2; зависимость этих величин от pH выражается уравнениями Хендерсона-Хассельбальха. Величина pK — это pH, при котором соответствующая группа диссоциирована на 50%. Изоэлектрическая точка pI представляет собой среднее арифметическое констант диссоциации. Если рассматривать процесс как чисто ионный обмен, то степень связывания аминокислоты с катионитом в кислой среде определяется величиной pK_1; степень связывания аминокислот на анионитах в щелочной среде определяется соответствующими величинами pK_2. Эта теоретическая зависимость нарушается другими сорбционными процессами, обусловленными взаимодействием боковых цепей аминокислот или пептидов с матрицей ионита. Аналогичная зависимость наблюдается при диссоциации и сорбции компонентов нуклеиновых кислот. Более подробно диссоциация и сорбция амфотерных ионов на ионитах обсуждаются в работе [122].

Таблица 5.2

Электролитическая диссоциация и ионообменная сорбция нейтральных пептидов и аминокислот



$H_2NCH(R_1)CONHCH(R_2)COOH$

$H_2NCH(R)COOH$

pK_2 ⟶ (NH₂-группа); pK_1 ⟶ (COOH-группа)

$$^{+}H_3NCH(R)COOH \underset{+H^+}{\overset{-H^+}{\rightleftharpoons}} H_3\overset{+}{N}CH(R)COO^- \underset{+H^+}{\overset{-H^+}{\rightleftharpoons}} H_2NCH(R)COO^-$$

Среда

кислая — нейтральная — основная

$$\text{КАТИОН} \overset{pK_1}{\rightleftharpoons} \text{ЦВИТТЕР-ИОН,} \overset{pK_2}{\rightleftharpoons} \text{АНИОН}$$

сорбированный на

катионите — анионите

K_1 соответствует $-COOH \rightleftharpoons -COO^- + H^+$

K_2 соответствует $-NH_3^+ \rightleftharpoons -NH_2 + H^+$

$$K_1 = \frac{[-COO^-][H^+]}{[-COOH]}, \quad -\log K_1 = pK_1;$$

$$K_2 = \frac{[-NH_2][H^+]}{[-NH_3^+]}, \quad -\log K_2 = pK_2;$$

Уравнения Хендерсона-Хассельбальха

$$pH = pK_1 + \log([-COO^-]/[-COOH])$$

$$pH = pK_2 + \log([-NH_2]/[-NH_3^+])$$

Изоэлектрическая точка

$$pI = \frac{pK_1 + pK_2}{2}$$

5.4. ОСНОВЫ ИОНООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Я. ШТАМБЕРГ

5.4.1. ХРОМАТОГРАФИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Если раствор низкомолекулярного соединения привести в контакт с набухшим ионитом, то на ионообменной фазе начнется процесс сорбции отдельных компонентов раствора, который будет продолжаться до тех пор, пока не наступит равновесие. Селективность этого процесса можно использовать для проведения хроматографических разделений на основе общих

принципов, применяемых и в других видах хроматографии (см. [43, 162]).

Наиболее типичный пример ионообменной хроматографии — разделение ионов в соответствии с их сродством к ионообменным группам. Самый старый метод фронтальной хроматографии обладает лишь немногими преимуществами. Лучшие результаты дает вытеснительная хроматография, однако наиболее эффективен метод проявительной хроматографии. Небольшое количество смеси ионов В и С, обладающих большим сродством к иониту, вводят в колонку вместе с ионами А, обладающими малым сродством к иониту. Величина вводимой пробы пренебрежимо мала по сравнению с полным объемом колонки. Элюирование ведут ионами А. Разделение определяется коэффициентами распределения K_d(B) и K_d(C) или фактором разделения K_d(B)/K_d(C). Коэффициент распределения — это отношение концентраций ионов в ионообменной фазе и в растворе, отнесенное к миллилитру раствора и к грамму (сухой массы) или миллилитру ионообменной фазы. При слишком большом K_d, например более 30, хроматографические зоны расширяются и увеличивается время, необходимое для разделения. Этого можно избежать, меняя в процессе элюирования дискретно или непрерывно концентрацию элюента (градиентное элюирование). Оптимальное разделение достигается в равновесных условиях, поэтому благоприятное влияние на процесс оказывает уменьшение размера зерен ионита, повышение температуры и оптимальная скорость потока подвижной фазы (все эти меры способствуют достижению равновесного состояния). Размер зерен можно уменьшать лишь до некоторого предела, который зависит от механической прочности слоя ионита; причем требования к стабильности формы зерен особенно жестки, когда элюент пропускают через колонку под действием избыточного давления (иногда до нескольких десятков атмосфер). Степень сшивки ионитов должна быть достаточно высокой, чтобы их объем оставался неизменным, или это должны быть макропористые иониты. Благоприятное действие оказывает увеличение скорости потока элюента в колонке, способствующее более равномерному распределению пленки жидкости по поверхности зерен ионита, но слишком сильное увеличение скорости может увести систему из оптимального равновесного состояния. Величины коэффициентов распределения зависят от состава элюента, и их можно регулировать в значительных пределах, добавляя комплексообразующие компоненты; например, при разделении лантанидов с этой целью используют органические оксикислоты.

Кроме собственно ионного обмена, в процессе ионообменного хроматографирования возникают и другие взаимодейст-

вия. Так, например, в процессе хроматографирования органических кислот решающую роль играет *физическая адсорбция* гидрофобных частей молекул на матрице ионита. Особая природа органических ионов используется *в хроматографии в водно-органических растворителях.* При проведении такого хроматографирования содержание воды в ионите больше, чем в окружающем растворе, и величина K_{pd} изменяется в сторону, благоприятствующую более гидрофильным молекулам. Водорастворимые неионные органические соединения разделяют на ионитах методом *высаливающей хроматографии.* Элюент при этом содержит сильный электролит, который вытесняет, например, спирты из водной фазы в ионообменную. Ионизованные соединения можно отделять от неионизованных методами *исключения иона* или *задержки иона.* Первый метод основан на доннановских взаимодействиях ионов с сильнодиссоциированными ионитами (исключение) и неионных соединений с матрицей ионита. При использовании второго метода применяют специальные иониты (так называемые структуры типа «змея в клетке», синтезируемые путем полимеризации акриловой кислоты в матрице сильноосновного анионита), которые удерживают все ионы электролита и исключают неионные вещества.

В литературе описан ряд методик работы с ионитами, синтезированными «по мерке». Регулируя пористость, можно получить сорбенты, работающие по принципу *молекулярных сит.* Неорганические катионообменники шабазиты применяют для разделения метил-, диметил- и триметиламинов, а ионообменные смолы — для разделения органических красителей. Меняя функциональные группы в полимерной матрице, можно получить иониты с самыми различными свойствами. Хелатообразующие полимеры применяют в хроматографии для разделения ионов металлов, аниониты в бисульфитной форме — для разделения альдегидов, а полимеры с восстанавливающими группами — электронообменники, окислительно-восстановительные смолы — для «восстановительной» хроматографии. В этих примерах ионообменная хроматография выступает в качестве общего хроматографического метода, в котором используются взаимодействия между макромолекулярными соединениями и низкомолекулярными компонентами.

5.4.2. ХРОМАТОГРАФИЯ БЕЛКОВ

Ю. МИКЕШ

Ионообменная хроматография амфотерных белков принципиально отличается от хроматографии аминокислот и низкомолекулярных пептидов. Как показал Тизелиус [211], она основана на селективной десорбции из ионитов при определенных

pH и ионной силе. Эта десорбция происходит по принципу «все или ничего»: белок либо полностью связывается и совсем не элюируется, либо при незначительном изменении условий полностью высвобождается и совершенно не удерживается ионитом. В результате в следующих друг за другом слоях или зонах ионита не происходит восстановления сорбционного равновесия, как в обычных хроматографических процессах, и поэтому для хроматографирования высокомолекулярных полипептидов не требуются длинные колонки. При дискретном или градиентном элюировании происходит лишь постепенная экстракция отдельных белков, сорбированных на слое ионообменника.

При выборе условий для хроматографирования белков учитывают изоэлектрическую точку и устойчивость белков. В изоэлектрической точке p*I* белок содержит одинаковое число катионных и анионных групп, и сорбция на гидрофильных ионитах минимальна. Эффективная сорбция происходит лишь при таком pH, который по крайней мере на одну единицу меньше (белок ведет себя как катион) или на одну единицу больше (белок ведет себя как анион) величины p*I* при малой ионной силе раствора (например, $\mu = 0{,}005-0{,}01$). Поэтому в области $pH < pI - 1$ белки можно хроматографировать на катионитах, а в области $pH > pI + 1$ — на анионитах. Нижний предел pH, до которого можно применять сульфированные или фосфатированные катиониты, равен примерно pH 2, а верхний предел для анионитов составляет 9,5. Карбоксильные катиониты практически применимы в интервале pH 4—10, что ограничивает возможности их использования в хроматографии. Выбор ионита определяется устойчивостью данного белка в этих критических областях pH или другими достаточно важными соображениями. Изменение pH в направлении к изоэлектрической точке способствует десорбции. Однако часто для элюирования не требуется изменять выбранную величину pH; в большинстве случаев достаточно повышать дискретно или непрерывно ионную силу элюирующих буферных растворов.

Теория ионообменной хроматографии рассматривается Поратом и Фриклундом [156], Новотным и сотр. [136, 137], а также Аранаем и Бороссом [6]. Практические рекомендации приводятся в работах [149, 207].

5.5. ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИОНИТОВ

Я. ШТАМБЕРГ

Разработано несколько методов определения таких характеристик ионообменника, как распределение частиц по размерам, масса и объем, способность к набуханию, обменные свой-

ства, гидродинамические характеристики слоя ионита в колонке и способность к длительному функционированию (см. [188, 190]). К наиболее важным характеристикам относятся обменная емкость, кривая титрования, плотность, набухаемость, а также размер и форма частиц. Если рассматривается катионит, то исследуется его H^+-форма, если слабоосновный анионит, то OH^--форма, и если сильноосновный анионит, то Cl^--форма.

5.5.1. ОБМЕННАЯ ЕМКОСТЬ

Емкость ионита выражают числом миллиэквивалентов (мэкв.), приходящихся на грамм сухого ионита или на миллилитр полностью набухшего ионита. При определении полной обменной емкости ионита устанавливают содержание в нем всех обмениваемых групп. Для этого используют небольшие колонки, например центрифужные колонки типа показанной на рис. 5.7, или воронки с бумажными фильтрами.

Полная емкость катионита. Примерно 2 мл смолы в H^+-форме промывают на воронке или в колонке 100 мл 0,1 н. раствора гидроксида натрия. Фильтрат собирают в мерной колбе (250 мл) вместе с этанолом, которым после фильтрации вымывают избыток щелочи, и доливают до метки водой. Избыток щелочи определяют титрованием. После этого смолу регенерируют 2 н. соляной кислотой и повторяют определение несколько раз до полного совпадения результатов титрования. Далее ионит переводят в H^+-форму и устанавливают его сухую массу. По результатам определения вычисляют емкость ионита в мэкв./г сухого ионита.

Полная емкость анионита. Примерно 2 мл смолы в Cl^--форме (если исследуется слабоосновный анионит, последующий цикл промывки ведут этанолом во избежание гидролиза) промывают, как описано выше, 200 мл 4%-ного раствора сульфата натрия, собирают фильтрат в мерную колбу емкостью 250 мл и доливают водой до метки. Определяют содержание хлорид-иона в аликвотной части раствора, регенерируют смолу 2 н. соляной кислотой до тех пор, пока она не освободится от сульфат-иона, и повторяют определение несколько раз. После этого смолу переводят в Cl^--форму и высушивают. Результат выражают в мэкв./г сухой смолы в Cl^--форме.

Мера кислотности или основности ионита — *относительная обменная емкость,* которую определяют путем разложения растворов нейтральных солей. Катионит в H^+-форме обрабатывают 1М раствором хлорида натрия и титруют в фильтрате высвобожденную кислоту. Если исследуется анионит, можно обработать OH^--форму смолы 1М раствором хлорида натрия и оттитровать выделившееся основание. Согласно другой методике

[187а], пользуются смолой в Cl^--форме и определяют одновременно полную и относительную емкости.

При работе с ионитами в колонках важное значение имеет *«емкость прорыва»*, или *доступная емкость*, ионита. Ее определяют в данной колонке и в данных условиях, проводя ионный

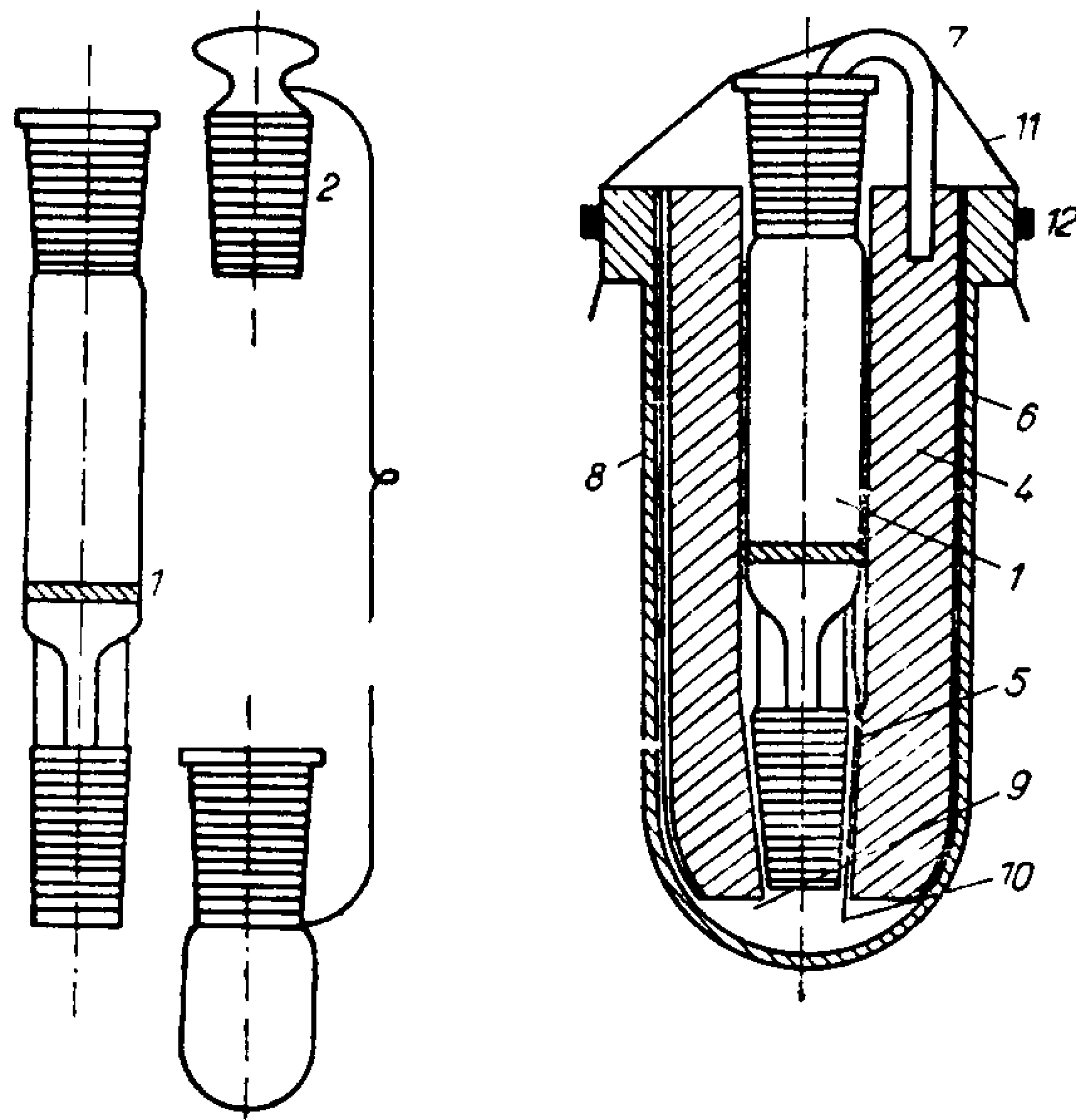


Рис. 5.7. Центрифужная колонка для определения набухаемости ионита [189].
1 — колонка; *2* — притертая стеклянная пробка 14/23; *3* — колпачок с притертым стеклянным шлифом 14/23; *4* — втулка из кусочка фенолформальдегидламината; *5* — конический переходник 1 : 10; *6* — металлическая капсула центрифуги; *7* — медная трубка с боковым отверстием для выравнивания давления; *8* — канал в ламинатной втулке для выравнивания давления; *9* — пространство для отцентрифугированной воды; *10* — бумажная полоска, облегчающая вынимание колонки после центрифугирования; *11* — двойная полиэтиленовая пленка, предотвращающая потерю воды в результате испарения; *12* — резиновое кольцо.

обмен вплоть до прорыва сорбируемого иона (появления его в элюате) и выражают обычно объемом слоя ионита.

Емкости ионитов, применяемых в хроматографии, приведены в табл. 5.4—5.7.

5.5.2. КРИВЫЕ ТИТРОВАНИЯ

Кислотность или основность обмениваемых групп лучше характеризовать не относительной емкостью, а кривыми pH-титрования (рис. 5.8). Получают эти кривые для ионитов в H^+- или OH^--форме (в соответствии с типом ионита), причем можно пользоваться двумя методиками.

В случае сильнодиссоциирующих ионитов с высокой обменной способностью, например сильнокислотных полистирольных

катионитов, пользуются прямым потенциометрическим титрованием (стеклянный электрод). Например, 1 г набухшего катионита в H^+-форме отделяют от раствора центрифугированием, добавляют к нему 100 мл 0,1М раствора хлорида натрия и

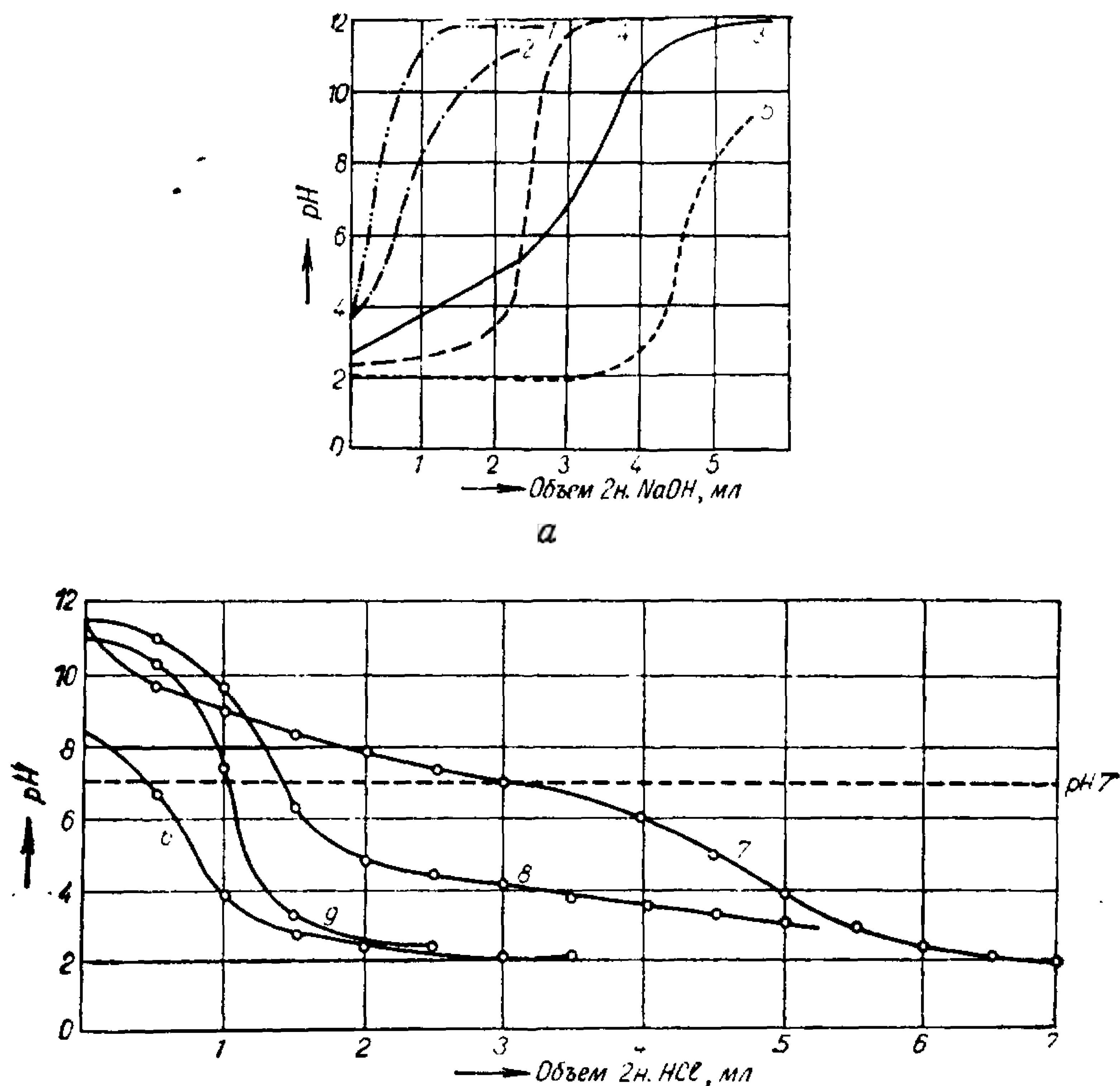


Рис. 5.8. Кривая титрования ионита [188].

а) Титрование катионитов: 1 — катионит с обмениваемой фенольной группой; 2 — земляная зелень — неорганический катионит на основе алюмосиликатов; 3 — карбоксильный катионит; 4 — катионит с сульфогруппами, связанными с алифатическими остатками; 5 — катионит с сульфогруппами, связанными с ароматическими остатками.

б) Титрование анионитов: 6 — слабоосновной анионит на основе ароматических аминов; 7 — среднеосновной на основе полиаминов; 8 — сильноосновной анионит на основе четвертичных солей пиридиния; 9 — сильноосновной анионит на основе четвертичных солей бензиламмония.

титруют взвесь из микробюретки 2М раствором гидроксида натрия. При этом важно делать паузы после добавления каждой порции (0,1—0,2 мл) реагента с тем, чтобы реакция прошла полностью.

В случае других ионитов проводят серию определений с пробами одной и той же массы, но с различными порциями тит-

ранта. Величину pH определяют после того, как в перемешиваемой смеси установится равновесие. Если иониты слабо диссоциируют и плохо набухают, для этого требуется 50 ч.

5.5.3. ПЛОТНОСТЬ И НАБУХАЕМОСТЬ

Плотность ионообменных смол определяют либо в сухом, либо в набухшем состоянии. Для этого применяют пикнометрический метод, но для сухих материалов используют жидкую среду, в которой ионит не набухает, например неразветвленный углеводород, а для набухших ионитов в качестве среды используют воду и взвешивают ионит после центрифугирования.

Для сухих и макропористых ионитов кроме истинной плотности (в углеводородной среде) определяют и кажущуюся плотность. При этом в качестве среды используют ртуть, которая не заполняет макропоры внутри частиц. По значениям истинной и кажущейся плотности можно вычислить полный объем пор ионита.

Таблица 5.3

Степень сшивки и набухаемость сульфированных стирол-дивинилбензольных катионитов [144]

Степень сшивки[а]	Набухаемость[б]	Степень сшивки	Набухаемость
2	3,45	10	0,83
4	1,92	15	0,59
6	1,36	20	0,48
8	1,04	25	0,38

[а] Степень сшивки характеризуется процентным содержанием дивинилбензола в смеси его со стиролом в процессе полимеризации матрицы ионита.

[б] Набухаемость (W. R.) характеризуется количеством воды в граммах, связанной 1 г совершенно сухой смолы при ее максимальном набухании.

Способность ионита к набуханию чаще всего выражают содержанием воды в полностью набухшей смоле, вычисленной в граммах воды в расчете на грамм сухой смолы (см. табл. 5.3). Избыток воды удаляют, центрифугируя ионит и высушивая его

под вакуумом до тех пор, пока масса ионита не перестанет изменяться; при такой обработке сильноосновного анионита температура не должна превышать 40 °С.

5.5.4. РАЗМЕР И ФОРМА ЧАСТИЦ

Распределение частиц ионита по размерам чаще всего определяют ситовым анализом ионита во влажном состоянии. Частицы ионита в воде разделяют на фракции с помощью стандартного набора сит; после этого либо измеряют объемы фракций мерным цилиндром, либо взвешивают их после центрифугирования. Результаты определения заносят в таблицу или

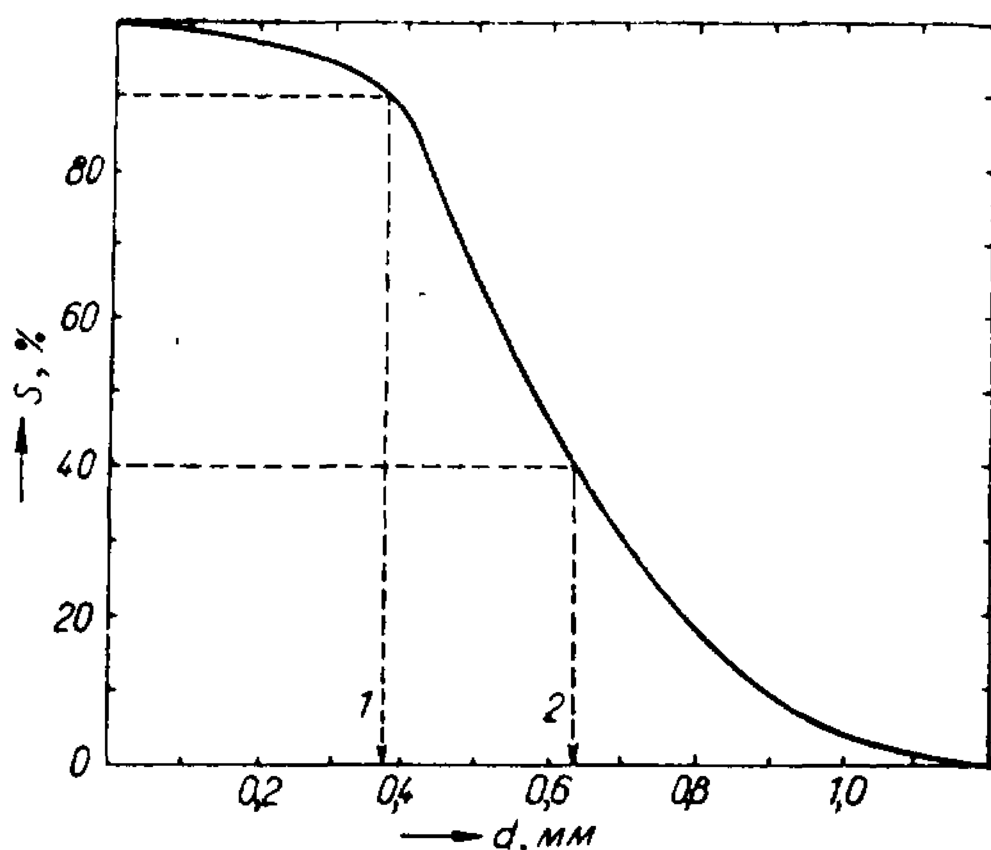


Рис. 5.9. Интегральная кривая распределения частиц ионита по размерам [188]. S — фракция образца (%), прошедшая сквозь сито; d — размер ячейки сита, мм; 1 — отсчет эффективного размера частиц $D_{эф} = d_{90\%}$; 2 — отсчет следующего размера частиц для вычисления коэффициента однородности $K_0 = d_{40\%}/d_{90\%}$.

строят кривую, соответствующую интегральному или дифференциальному распределению (рис. 5.9). Распределение частиц по размерам в тонкоизмельченных ионитах определяют по микрофотографии. При этом для получения воспроизводимых результатов необходима выборка порядка 500—1000 частиц. Одновременно с этим можно оценить недостатки формы частиц и обнаружить трещины и сколы в отдельных частицах.

Форму частиц проверяют, например, путем определения степени их сферичности. Высушенный ионит помещают на гладкую плоскую поверхность, слегка наклоненную к горизонтали (1 : 12), и определяют долю частиц, скатывающихся с этой поверхности. Однако такая методика применима лишь для частиц достаточно большого размера.

5.6. ПОДГОТОВКА ИОНИТОВ К ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОМУ ПРОЦЕССУ, ИХ РЕГЕНЕРИРОВАНИЕ И ХРАНЕНИЕ

Чтобы хроматографирование прошло успешно, все подготовительные операции необходимо проводить столь же тщательно, как и сам процесс разделения. Плохо регенерированный или неправильно приведенный в состояние равновесия ионит может нарушить ход всех дальнейших операций и привести к потере анализируемой пробы.

5.6.1. ВЫБОР ИОНИТА

Выбор ионита можно ускорить, если воспользоваться таблицами, в которых приведены характеристики ионитов различных типов, имеющихся в продаже (табл. 5.4—5.7). Более подробные таблицы приведены в работах [5, 25, 118, 123, 139]. Для разделения *неорганических соединений* пригодны ионообменные смолы (табл. 5.4) или неорганические иониты (табл. 5.7). Для хроматографирования низкомолекулярных ионогенных *органических соединений* (аминов и других оснований, кислот, аминокислот, пептидов, нуклеозидов, нуклеотидов) следует пользоваться ионообменными смолами. Однако они непригодны для анализа белков. *Биополимеры* (белки, нуклеиновые кислоты и их высокомолекулярные фрагменты) можно успешно разделять на ионообменных производных целлюлозы (табл. 5.5), полидекстрана и агарозы (табл. 5.6). Для высокоэффективной жидкостной хроматографии биополимеров предназначены биополимерные ионообменные производные макропористого стекла (табл. 5.6А) и гидрофильные макропористые оксиалкилметакрилатные полимеры (табл. 5.6Б).

Соединения основного характера (а также амфотерные ионы в слабокислой среде) хроматографируют в виде катионов на катионитах, а соединения кислотного характера (а также амфотерные ионы в слабоосновной среде) — в виде анионов на анионитах. Для хроматографического разделения катионов или анионов предпочтительно пользоваться сильнокислотными катионитами или сильноосновными анионитами. Слабокислотные катиониты или слабоосновные аниониты чаще всего применяют в специальных случаях, например селективное исключение оснований или кислот из раствора без одновременного разложения присутствующих в нем солей и т. п. *Амфотерные биополимеры* или их фрагменты можно хроматографировать на сильно- и слабокислотных катионитах, а также на сильно- и слабоосновных анионитах. Выбор типа ионита определяется изоэлектрической точкой хроматографируемого материала (см.

Торговая марка	Фирма-изготовитель или поставщик[б]	Тип полимерной матрицы	Функциональная группа	Форма
Сильнокислотные				
AG-50, AG-50W (дауэкс 50, 50W)	Bio-Rad (DowCh)	Стирольная	$C_6H_5SO_3^-$	H^+
AG MP-50	Bio-Rad	Стирольная	$C_6H_5SO_3^-$	H^+
Амберлит CG-120	RoHa	Стирольная		
Биорекс 40 (дуолит С-3)	Bio-Rad (DiaSh)	Фенольная	$RCH_2SO_3^-$	H^+
Зеокарб 225 (зеролит 225)	UWS	Стирольная	$C_6H_5SO_3^-$	Na^+
Среднекислотные				
Биорекс 63 (дуолит С-63)	Bio-Rad (DiaSh)	Стирольная	$C_6H_5SO_3^-$	Na^+

для хроматографии[a]

Степень сшивки	Форма[в] и размер частиц, меш	Емкость[г]		Устойчивость[д]	Допустимый интервал pH
		мэкв./г	мэкв./мл		
катиониты					
1	ш.:50—100	5,0	0,4	150 °C	0—14
2	ш.:50—100, 100—200, 200—400	5,2	0,7	(H^+, Na^+)	
4	ш.:20—50, 50—100, 100—200, 200—400, >400	5,2	1,2	о. В., Р.	
8	ш.:20—50, 50—100, 100—200, 200—400, >400	5,1	1,7		
10	ш.:20—50	5,0	1,9		
12	ш.:20—50, 50—100, 100—200, 200—400, >400	5,0	2,3		
16	ч.:20—50	4,9	2,6		
16	ч.:50—100, 100—200, 200—400				
Мелкопористый	ч.:50—100, 100—200, 200—400	1,6	1,8		
8	ш.:100—200, >200	4,3		120 °C	1—14
	ч.:20—50, 50—100, 100—200, 200—400, >400	2,9	1,2 (Na)	40 °C; в., р., н.	
1	ш.:14—52, 52—100, 100—200, >200	4,5—0,0 2,1		120 °C; о., в., р.	0—14
2	ш.:14—52, 52—100, 100—200, >200				
4,5	ш.:14—52, 52—100, 100—200, >200				
8	ш.:14—52, 52—100, 100—200, 2—200				
12	ш.:14—52, 52—100, 100—200, >200				
20	ш.:14—52, 52—100, 100—200, >200				
катиониты					
Крупнопористый	ш.:20—50, 50—100, 100—200, 200—400	6,6	3,1	100 °C; о., в., р.	0—14

Торговая марка	Фирма-изготовитель или поставщик[б]	Тип полимерной матрицы	Функциональная группа	Форма
				Слабокислотные
Амберлит CG-50	RoHa	Метакриловая	$RCOO^-$	H^+
Биорекс 70 (дуолит CS-101)	Bio-Rad	Акриловая	$RCOO^-$	Na^+
Зеокарб 226 (зеролит 226)	UWS	Акриловая	$RCOO^-$	H^+
				Сильноосновные
AG-1 (дауэкс 1AG)	BioRad (DowCh)	Стирольная	$C_6H_5CH_2\overset{+}{N}\cdot(CH_3)_3$	Cl^-
AG-2 (дауэкс 2AG)	Bio-Rad (DowCh)	Стирольная	$C_6H_5CH_2\overset{+}{N}\cdot(CH_3)_3\cdot C_2H_5OH$	Cl^-
AG-21K (дауэкс 21 KAG)	Bio-Rad (DowCh)	Стирольная	$C_6H_5CH_2\overset{+}{N}\cdot(CH_3)_3$	Cl^-
AG MP-1	Bio-Rad	Стирольная	$C_6H_5CH_2\overset{+}{N}\cdot(CH_3)_3$	Cl^-
Амберлит CG-400	RoHa	Стирольная	$C_6H_5CH_2\overset{+}{N}\cdot(CH_3)_3$	Cl^-
Биорекс 9	Bio-Rad	Стирольная	Фенилпиридиниевая	Cl^-
Деасидит FF	UWS	Стирольная	$C_6H_5CH_2\overset{+}{N}\cdot(CH_3)_3$	Cl^-

Степень сшивки	Форма[в] и размер частиц, меш	Емкость[г]		Устойчивость[д]	Допустимый интервал pH
		мэкв./г	мэкв./мл		
катиониты					
2—3	100—200, >200	10		120 °C	4—14
Мелкопористая	ш.:20—50	10,2 (H^+) 3,3 (H^+)		100 °C; о., в., р.	
2,5	ш.:14—52, 52—100, 100—200, >200	9—10 3,5		о., в., р.	4—14
аниониты					
1	ш.:50—100	3,2 (3,6)	0,4	50 °C (OH^-)	0—14
2	50—100, 100—200, 200—400, >400	3,5 (3,6)	0,8 (0,9)	150 °C (Cl^-)	
4	ш.:20—50, 200—400,	3,5	1,2		
8	20—50, 200—400	3,2 (3,5)	1,4		
10	200—400	3,2	1,5		
1	ш.:20—50	3,2 (3,7)	1,2	30 °C $(OH)^-$	0—14
8	ш.:20—50, 50—100, 100—200, 200—400	3,2 (3,6)	1,4	150 °C (Cl^-) Р., В., н.	
10	ш.:50—100, 100—200, 200—400	3,0	1,5		
(4)	ш.:16—20, 20—50, 50—100	4,5	1,3	50 °C (OH^-)	0—14
Мелкопористая	ш.:20—50	1,0			
	ч.:50—100, 100—200, 200—400				
	ш.:100—200, >200	3,3	1,2	60 °C (OH^-), 75 °C (Cl^-)	0—12
	ш.:20—50	3,7	1,3	38 °C	0.
	ч.:50—100, 100—200, 200—400				
2—3	ш.:14—52, 52—100, 100—200, 200	4,2	1,5	60 °C (OH^-) в., Р., н.	0—14
3—5	ш.:14—52, 52—100, 100—200, 200				
7—9	ш.:14—52, 52—100, 100—200, 200				

Торговая марка	Фирма-изготовитель или поставщик[б]	Тип полимерной матрицы	Функциональная группа	Форма
				Среднеосновные
Биорекс 5	Bio-Rad	Полиалкиновая	$R\overset{+}{N}(CH_3)_2 \cdot C_2H_5OH$	Cl^-
(дуолит А 30)	(DiaSh)	Аминовая	и $R\overset{+}{N}H(CH_3)_2$	
Деасидит Н	UWS	Стирольная	$C_6H_5CH_2\overset{+}{N}H \cdot (CH_3)_2$ и $(C_6H_5CH_2)_2 \cdot \overset{+}{N}(CH_3)_2$	Cl^-
				Слабоосновные
AG-3 (дауэкс 3)	Bio-Rad (DowCh)	Стирольная	$C_6H_5\overset{+}{N}HR_2$	Cl^-
Амберлит CG-45	RoHa	Стирольная	Полиаминная	OH^-
Амберлит CG-4B	RoHa	Фенольная	Аминная	OH^-
Амберлист A-21	RoHa		*трет*-Аминная	
Деасидит G	UWS	Стирольная	$—CH_2\overset{+}{N}H \cdot (CH_2H_5)$	Cl^-
Деасидит М (зеролит М)	UWS		Полиаминная	Cl^-

[а] В настоящее время выпускается чрезвычайно много ионообменных смол, привести их всех практически невозможно. В данную таблицу мы включили лишь некоторые органические иониты (хроматографически чистые CG и аналитически чистые AG), пригодные для обычных хроматографических анализов. Иониты специального назначения, например предназначенные для анализа аминокислот, здесь не рассматриваются. Кроме указанных в таблице ионитов, выпускается ряд ионитов обычной степени чистоты, которые также можно использовать в лаборатории. С этой целью подбирают соответствующую фракцию и обрабатывают ее по принятой методике. Для работы с радиоактивными ионами выпускаются специальные иониты (радиоактивной чистоты RC); в этой таблице они не приводятся.

[б] Bio-Rad — Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, USA.
DiaSh — Diamond Shamrock, Radwood City, California, USA; производит иониты типа дуолита, которые доводятся до аналитической степени чистоты фирмой Bio-Rad Laboratories.
DowCh — Dow Chemical Co., Midland, Michigan, USA; производит иониты типа дауэкс, которые очищаются и фракционируются фирмой Bio-Rad Laboratories; эти иониты выпускаются под индексом AG и BioRex.

Степень сшивки	Форма[в] и размер частиц, меш	Емкость[г]		Устойчивость[д]	Допустимый интервал pH
		мэкв./г	мэкв./мл		
аниониты					
	ш.:20—50 200, 200—400	8,8	2,8	60 °C о., в., р.	
		3,8			
2—3	14—25, 52—100, 100—200, 200				
3—5	14—25, 52—100, 100—200, 200				
7—9	14—25, 52—100, 100—200, 200				
аниониты					
4	ш.:20—50 ч.:100—200, 200—400	2,8	1,9	65 °C	0—7
	ш.:100—200, >200	5	2	100 °C	0—9
	ч.:100—200, 200—400	10	2,5	40 °C	0—7
Мелкопористая	ч.:150—280		1,7		
2—3	ш.:14—52, 52—100, 100—200, >200				
3—5	14—52, 52—100, 100—200, >200				
7—9	14—52, 52—100, 100—200, >200				
3—5	14—52, 52—100, 100—200, >200	6			

RoHa — Rohm and Haas Co., Philadelphia, Pennsylvania, USA; производит иониты типа амберлита, которые поставляет фирма Mallinckrodt Chemical Works, St. Louis, Mo., USA.

UWS — United Water Softeners, Gunnersbury Avenue, London; обрабатывает иониты типа деасидит и зеокарб, поставляемые фирмой Zerolit Ltd. (London), Pemberton House, 632—652, London Road, Isleworth, Middlesex, England. Иониты типа зеролит с такими же цифровыми и буквенными индексами производит фирма Permutit Company Ltd.; United Kingdom, поставляет их фирма BDH Chemical Ltd., Poole, BH 124NN, England.

[в] ш. — шарики; ч. — измельченные частицы. Перевод меш в мкм см. в табл. 4.2 (гл. 4).

[г] мэкв./г — по отношению к сухой смоле; мэкв./мл — по отношению к полностью набухшей смоле.

[д] Температура обработки; о. — устойчив к действию окислителей, О. — весьма устойчив к их действию; в. — устойчив к действию восстановителей, В. — весьма устойчив к их действию; р. — устойчив к действию органических растворителей, Р. — весьма устойчив к их действию; и. — неустойчив к действию окислителей.

Таблица 5.5

Ионообменные производные целлюлозы, имеющиеся в продаже

Химическое наименование	Торговая марка [а] (с. — целлюлоза)	Тип ионита	Функциональная группа	Противоион	Длина [б] частиц, мкм	Емкость для малых ионов [в], мэкв./г
Аминоэтилцеллюлоза	AE-c. (Serva), Cellex	Слабоосновный анионит	$-(CH_2)_2-NH_2$	—	20—300	0,3—0,4
Карбоксиметилцеллюлоза	Cellex CM (Bio-Rad), CM-c. (ApSci; Serva), CM-Neo-Cal (Serva), CM1-CM52-c. (Whatman), MN 2100 CM (MaNa), No 76-c. (SchSch)	Слабокислотный катионит	$-CH_2-COO^-$	Na^+	20—300	0,6—1,0
Диэтиламиноэтилцеллюлоза	Cellex D (Bio-Rad), DE 11 — DE 52-c. (Whatman), DEAE-c. (MaNa; Serva), MN 2100 DEAE (MaNa), No 70-c. (SchSch)	Среднеосновный анионит	$-(CH_2)_2-\overset{+}{N}H(C_2H_5)_2$	Cl^-, OH^-	20—1000	0,2—1,0
	DEAE-Sephacel (Pharmacia)			Cl^-		1,3—1,5
Эктеолацеллюлоза	Cellex E (Bio-Rad), ECTEOLA-c. (MaNa; Serva), Et 11 (Whatman), MN 2100 ECTEOLA-c. (MaNa), No 73-75-c. (SchSch)	Слабо- и среднеосновный анионит	Аминные	Cl^-	20—300	0,3—0,5
Гуанидоэтилцеллюлоза	Cellex GE (BioRad)	Сильноосновный анионит	$-(CH_2)_2-NH\overset{\overset{+}{N}H}{\overset{\Vert}{C}}NH_2$	Cl^-	20—300	0,3—0,5

Продолжение табл. 5.5

Химическое наименование	Торговая марка [а] (с. — целлюлоза)	Тип ионита	Функциональная группа	Противоион	Длина [б] частиц, мкм	Емкость для малых ионов [в], мэкв./г
Фосфоцеллюлоза	Cellex P (Bio-Rad), MN 2100P (MaNa), MN 2100 poly P (NaNa), P-c. (ApSci; Serva), No 79-c. (SchSch), P_1-P_{11} (Whatman)	Среднекислотный катионит	$—P(O)(O^-)_2$	Na^+, NH_4^+	20—1000	0,8—7,4
Полиэтиленимино-целлюлоза	MN 2100 Pet-c. (MaNa), PEI-c.	Среднеосновный анионит	$—(C_2H_4\overset{+}{N}H)_n—C_2H_4\overset{+}{N}H_2$		20—300	0,1—0,3
Сульфоэтилцеллюлоза	(Serva)	Сильнокислотный катионит	$—(CH_2)_2—SO_3^-$	Na^+	20—300	0,15—0,35
Триэтиламиноэтил-целлюлоза	Cellex T (Bio-Rad), TEAE-c. (MaNa; Serva)	Сильноосновный анионит	$—(CH_2)_2—\overset{+}{N}(C_2H_5)_3$	Cl^-	20—300	0,4—0,75

[а] Фирмы-изготовители: ApSci: Applied Science Laboratories, Inc.; Bio-Rad Laboratories, Calif., Richmond, USA; MaNa: Macherey-Nagel & Co., Düren, BRD; Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden; Serva Feinbiochemica, Heidelberg, BRD; SchSch: Schleicher and Schüll, Zürich, Switzerland; Whatman Biochemical Ltd., Springfield Mill, Maidstone, Kent, England.

[б] Средняя ширина частиц целлюлозы равна 18 мкм. Приведенные значения длины, как правило, показывают лишь разброс по длине, указанный в паспорте продукта. Более подробная спецификация продуктов приведена в литературе, выпускаемой фирмами-изготовителями.

[в] В большинстве случаев приведенные величины показывают лишь диапазон емкости перечисленных в таблице ионитов, но не характеризуют отдельные продукты; см. предыдущее замечание.

Таблица 5.6

Ионообменные производные полидекстрана и агарозы, имеющиеся в продаже

Торговая марка [а]	Тип производного	Тип ионита	Функциональная группа	Противоион	Емкость для малых ионов, мэкв./г	Емкость по гемоглобину, г/г	Допустимый интервал pH
CM-сефадекс C-25	Карбоксиметильное	Слабокислотный катионит	$-CH_2-COO^-$	Na^+	4,5±0,5	0,4	6—10
CM-сефадекс C-50	»	»	$-CH_2-COO^-$	Na^+		9	
DEAE-сефадекс A-25[б] DEAE-сефадекс A-50	Диэтиламиноэтильное	Среднеосновный анионит	$-(CH_2)_2-\overset{+}{N}H(C_2H_5)_2$	Cl^-	3,5±0,5	0,5	9—2
DEAE-сефадекс A-50	»	»	$-(CH_2)_2-\overset{+}{N}H(C_2H_5)_2$	Cl^-		5	
QAE-сефадекс A-25	Четвертичное аминоэтильное[в]	Сильноосновный анионит	$-(CH_2)_2-\overset{+}{N}(C_2H_5)_2-CH_2CH(OH)CH_3$	Cl^-	3,0±0,4	0,3	10—2
QAE-сефадекс A-50	Четвертичное аминоэтильное[в]	Сильноосновный анионит	$-(CH_2)_2-\overset{+}{N}(C_2H_5)_2-CH_2CH(OH)CH_3$	Cl^-		6	
SE-сефадекс C-25[г]	Сульфоэтильное	Сильнокислотный катионит	$-(CH_2)_2-SO_3^-$	Na^+	2,3±0,3	0,2	2—10

Продолжение табл. 5.6

Торговая марка[а]	Тип производного	Тип ионита	Функциональная группа	Противоион	Емкость для малых ионов, мэкв./г	Емкость по гемоглобину, г/г	Допустимый интервал pH
SE-сефадекс C-50	Сульфоэтильное	»	$-(CH_2)_2-SO_3^-$	Na^+		3	
SP-сефадекс C-25	Сульфопропильное	»	$-(CH_2)_2-SO_3^-$	Na^+	2,3±0,3	0,2	10—2
SP-сефадекс C-50	»	»	$-(CH_2)_2-SO_3^-$	Na^+		7	
CM-сефароза	Карбоксиметильное	Слабокислотный катионит	$-CH_2COO^-$	Na^+	13±2	10,0	3—10
DEAE-сефароза	Диэтиламиноэтильное	Среднеосновный анионит	$-(CH_2)_2-\overset{+}{N}H(C_2H_5)_2$	Cl^-	12±2	10,0	3—10

[а] Сефадекс и сефароза — торговые марки ионитов фирмы Pharmacia, Upsala, Sweden. Ионообменные производные сефадекса получают из неионогенных материалов G-25 и G-50 (см. табл. 6.1), буквой C обозначен катионит, буквой A — анионит. Иониты с индексом 50 пригодны для хроматографирования соединений молекулярной массы 30 000—3 000 000, а иониты с индексом 25 — для соединений меньшей и большей молекулярной массы (последние лишь адсорбируются на поверхности частиц). Все материалы поставляются в форме сферических частиц размером 40—120 мкм. Иониты типа сефароза получают из сшитого геля агарозы сефароза CL-6B (см. табл. 6.4). Они имеют форму сферических частиц размерами 40—160 мкм (в гидратированном состоянии); предел исключения составляет около $1 \cdot 10^6$. Поставляются в виде густых суспензий с добавками антимикробных агентов.

[б] Бензоилированный вариант DEAE-сефадекса A-25, называемый BD-сефадекс, применяется в хроматографии рибонуклеиновых кислот. Его емкость для малых ионов равна 2,4 мэкв./г, а для тРНК она равна примерно 20 мг на 1 мл слоя. Степень бензоилирования соответствует примерно 5 мэкв. бензоильных групп на 1 г. И бензоильные, и диэтиламиноэтильные группы непосредственно связаны с глюкозными остатками сшитой полидекстрановой матрицы.

[в] Точнее, диэтил-(2-оксипропил)аминоэтильное производное.

[г] Начиная с 1970 г. вместо материала SE-сефадекс выпускается материал SP-сефадекс с аналогичными свойствами.

Таблица 5.6А

Иониты на основе пористого стекла с контролируемой поверхностью[a]

Торговая марка	Тип производного	Тип ионита	Функциональная группа	Емкость для малых ионов, мэкв./г
СМ-гликофаза	Карбоксиметильное	Слабоосновный катионит	$-Si(CH_2)_3OCH_2CH(OH)CH_2OCH_2COOH$	0,1
DEAE-гликофаза	Диэтиламиноэтильное	Среднеосновный анионит	$-Si(CH_2)_3OCH_2CH(OH)CH_2O(CH_2)_2N(C_2H_5)_2$	0,1 0,1
QAE-гликофаза	Четвертичное аминоэтильное	Сильноосновный анионит	$-Si(CH_2)_3OCH_2CH(OH)CH_2O(CH_2)_2\overset{+}{N}(C_2H_5)_3Cl^-$	0,05
SP-гликофаза	Сульфопропильное	Сильнокислотный катионит	$-Si(CH_2)_3OCH_2CH(OH)CH_2O(CH_2)_3SO_3H$	0,05

[a] Иониты этого типа состоят из стеклянных зерен с контролируемой пористостью. Внутренняя и внешняя поверхности зерен покрыты гидрофильным монослоем (ковалентно связанное производное глицерина), одна из гидроксильных групп которого замещена на ионогенную группу. Диаметр пор 25 мкм, внутренняя удельная поверхность 130 м²/г, объем пор>1,0 см³/г. Изготовитель: Corning Glass, USA; поставщик: Pierce, Box 117, Rockford, Illinois 61 105, USA.

Таблица 5.6Б

Иониты типа сферон

Торговая марка	Тип ионита	Структурная единица и функциональная группа	Размер зерен[a], мкм	Обменная емкость, мэкв./г	Примечания
Сферон С 1000	Слабокислотный катионит	CH_3—C(CH_2—)—$COOCH_2COOH$	>25, 25—40	2,0±0,25	
Сферонфосфат 1000	Среднекислотный катионит	CH_3—C(CH_2—)—$COOCH_2CH_2OPO_3H_2$	>25, 25—40, 40—63	3,5±0,5	
Сферон S 1000	Сильнокислотный катионит	CH_3—C(CH_2—)—$COOCH_2CH_2OCH_2CH_2CH_2SO_3H$	>25, 25—40, 40—63	1,5±0,25	
Сферон DEAE	Основной анионит от слабого до среднего	CH_3—C(CH_2—)—$COOCH_2CH_2OCH_2CH_2N(C_2H_5)_2$	>25, 25—40, 40—63	1,5±0,25	

Торговая марка	Тип ионита	Структурная единица и функциональная группа	Размер зерен[a], мкм	Обменная емкость, мэкв./г	Примечания
Сферон TEAE 1000	Сильноосновный анионит	$CH_3-C(-CH_2-)-COOCH_2CH_2OCH_2CH_2N(C_2H_5)_2$	>25, 25—40, 40—63	1,4±0,25	
Сфероноксин 1000	Хелатирующий ионит	$CH_3-C(-CH_2-)-COOCH_2CH_2OCH_2CH_2SO_2-C_6H_4-N=N-C_9H_5N(OH)$ 40–63		мин. 0,20	Обменная емкость (ммоль/г) для Cu^{2+} в 0,05М HCl
Сферонсалицил 1000	То же	$CH_3-C(-CH_2-)-COOCH_2CH_2OCH_2CH_2SO_2-C_6H_4-N=N-C_6H_3(OH)(COOH)$ 40–63		мин. 0,20	Обменная емкость (ммоль/г) для Cu^{2+} в 0,1М ацетатном буфере с pH 5

[a] Размер набухших зерен. Крупнопористый оксиалкилметакрилат. Гели сферон и их производные изготавливает фирма Lachema, n. p., Брно, Чехословакия. Экспортирует их фирма Chemapol, Прага. Ср. табл. 6.3А.

Таблица 5.7

Неорганические иониты, имеющиеся в продаже (ионообменные кристаллы)

Торговая марка[а]	Тип ионита (состав)	Размер зерен, меш	Емкость,		Примечания	Химическая устойчивость
			мэкв./г	мэкв./мл		
Биорад ZP-1	Катионит [фосфат циркония(IV)]	20—50, 50—100, 100—200	1,5	1,5	Сорбция[б] Cs^+ при pH 4	К действию сильных кислот до pH 13
Биорад AMP-1	Катионит (фосфомолибдат аммония)	Микрокристаллический	1,2	0,4	Объемная емкость относится к AMP-асбесту (1 : 1 по объему)	К действию сильных кислот до pH 6
Биорад HZO-1	Анионит и катионит [гидроксид циркония(IV)]	20—50, 50—100, 100—200	1,5	1,4	Анионообменная емкость, измеряемая по сорбции $Cr_2O_7^{2-}$ при pH 1	От pH до 5 н. основания

[а] Фирма-изготовитель Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif. 94804, USA.

[б] Емкость зависит от pH и изменяется в пределах 1—4,8.

разд. 5.4.2). Для белков кислотного характера берут анионит, а для белков основного характера — катионит. Для хроматографирования белков пригодны диполярные иониты; пока их получают сами хроматографисты, но скоро они должны появиться в продаже.

Для хроматографии на ионообменных смолах предпочитают пользоваться монофункциональными (гомоионными) ионитами. Обычно это смолы типа стирол-дивинилбензол. Наличие в смоле функциональных групп лишь одного типа позволяет надеяться на более четкое разделение. Параметры хроматографического процесса должны быть таковы, чтобы при движении подвижной фазы в колонке существовало равновесие между подвижной и неподвижной фазами. Решающую роль при этом играет размер частиц ионита. Чем мельче частицы, тем быстрее устанавливается равновесие, т. е. тем большей может быть скорость потока подвижной фазы. В то же время с уменьшением размера частиц растет гидродинамическое сопротивление колонки. Если частицы ионита достаточно прочны (неорганические иониты, ионообменные смолы), то хроматографирование можно вести под давлением (см. гл. 8). Некоторые более мягкие иониты, например на основе полидекстрана, не выдерживают повышенных давлений. В любом случае необходимо выявить оптимальный вариант. Типичные размеры частиц ионитов, предназначенных для различных целей, приведены в табл. 5.8. В хроматографии очень важно применять как можно более однородные по размеру частицы, поэтому поступающие в продажу хроматографические иониты фракционируют по размерам частиц. Частицы традиционных ионообменных целлюлоз представляют собой не шарики, а палочки диаметром 18—20 мкм и длиной 20—300 мкм; однако недавно удалось получить целлюлозные иониты в виде шариков. В промышленных или пилотных установках следует использовать смолы с более крупными частицами, например размером 850—2000 мкм (т. е. 10—20 меш).

Важный фактор, часто определяющий выбор ионита, — это *степень сшивки*. Она должна быть достаточно большой, но при этом молекулы анализируемых соединений должны проникать в ионит. Если поры чрезвычайно малы, анализируемые соединения не могут проникать к внутренним функциональным группам ионита, а если поры слишком велики, ухудшается эффективность разделения. Высокая степень сшитости (например, X8 и выше) допустима для разделения небольших по размеру неорганических и органических ионов (например, аминокислот). Иониты типа X4 применяют для разделения низкомолекулярных пептидов и других ионов среднего размера, иониты типа X2 — для разделения полипептидов и ионов больших размеров,

Таблица 5.8

Размеры зерен ионообменных смол, применяемых в лаборатории

Область применения	Размер зерен[a],	
	меш	мкм
Ионный обмен и другие нехроматографические операции	20—50	300—850
Ситовой анализ ионов	<30	>500
Разделение неорганических ионов	50—100	140—300
Высокоэффективная препаративная хроматография	100—200	75—140
Препаративная хроматография биохимических продуктов	200—400	40—80
Высокоэффективная аналитическая хроматография биохимических продуктов		10—30
Скоростной анализ методом жидкостной хроматографии при высоких давлениях		5—10
Предельная величина для жидкостной хроматографии при высоких давлениях		2—3

[a] Перевод единиц английской системы (меш) и других систем классификации степени зернения в единицы метрической системы приведен в табл. 4.2.

но не макромолекул (последние можно разделять на ионитах с макропористой матрицей).

5.6.2. ДЕКАНТАЦИЯ И НАБУХАНИЕ

Из свежей порции ионита нужно удалить коллоидные примеси (особенно если ионит, предназначенный для хроматографирования, специально не фракционировали) и затем дать ей набухнуть. С этой целью суспендируют в 10-кратном объеме воды и затем дают суспензии осесть. Эту процедуру проводят в цилиндрическом сосуде. Ионообменные производные полидекстрана, чрезвычайно сильно набухающие в чистой воде, суспендируют в 0,01М буферном растворе. Через некоторое время (от нескольких минут до получаса), определяемое типом ионита и размером его гранул, когда большинство частиц осядет на дно сосуда, жидкость, содержащую самые мелкие частицы, сливают. Этот процесс повторяют несколько раз до тех пор, пока сливаемая жидкость не станет чистой. Скорость набухания ионита зависит от его типа и формы, в которой он приготовлен. Как правило, для полного набухания ионита достаточно оставить его в жидкости на ночь. Этот процесс можно ускорить (до одного часа или менее), поместив стакан со взвесью на водяную баню (вплоть до 100 °С); ионообменные производные полидекстрана и целлюлозы нагревают только в нейтральной среде.

В продаже имеются производные целлюлозы, с которыми уже проводилась операция набухания; такие адсорбенты не подвергают описанной выше обработке. Чрезвычайно мелкие частицы ионообменных смол (размером менее 40 мкм, т. е. мельче 400 меш) оседают плохо, и такие смолы не удается очистить простой декантацией.

5.6.3. ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ ЧАСТИЦ ПО РАЗМЕРАМ В ЛАБОРАТОРИИ

Иониты можно фракционировать, просеивая их в сухом или влажном состоянии. Различие в размерах частиц, измеряемых этими методиками, обусловлено набуханием. При работе с металлическими ситами катиониты должны всегда быть в солевой форме. Чтобы добиться лучшего фракционирования осаждением, применяют также гидравлические методики. Методика такого разделения описана в работах [66, 123, 128, 235]. Однако в настоящее время в продаже имеются достаточно узкие фракции ионитов, специально предназначенных для хроматографии (ГХ, хроматографические иониты), поэтому заниматься фракционированием ионитов в лаборатории нецелесообразно. Если экспериментатору покажется, что случайно смешаны две фракции ионита, то проверить это довольно просто: чем более однороден ионит по размерам частиц, тем более четкая граница его слоя в процессе декантации (сосуд с ионитом после перемешивания должен оставаться в покое), причем эта поверхность должна быть единственной.

5.6.4. ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ ОБРАБОТКА ИОНИТА

Приобретенный у изготовителя ионит нельзя использовать для тонких хроматографических анализов без предварительной обработки, поскольку он содержит разного рода примеси и органические и неорганические. Ионит экстрагируют органическими растворителями (по крайней мере, спиртом и ацетоном), после чего подвергают специальной обработке. Экстракцию ведут при слегка повышенной температуре на фильтрах из пористого стекла до тех пор, пока фильтрат не станет бесцветным и не перестанет давать сухой остаток. Имеющиеся в продаже иониты для аналитических целей (аналитически чистые) уже очищены экстракцией, в частности от следовых элементов, и для них этой операции не требуется.

Предварительная обработка ионита предусматривает перевод его из одной формы в другую; например, катионит переводят из Na^+-формы в H^+-форму и наоборот, анионит переводят из Cl^--формы в OH^--форму и наоборот. В процессе такой обра-

ботки ионита меняется его структура. Функциональные группы становятся более доступными, и одновременно ионит освобождается от неорганических примесей, внесенных в него в процессе изготовления. Большинство авторов считают, что свежий ионит перед употреблением необходимо подвергнуть предварительной обработке.

Обработку ионита лучше всего вести на воронке Бюхнера, промывая его двойным или тройным объемом раствора регенерирующих реагентов при комнатной температуре. Обработку каждой порцией реагента ведут не менее 10—15 мин, после чего раствор отсасывают и заливают ионит новой порцией реагента. Катионит, например, промывают последовательно 1—2М раствором гидроксида натрия (3—5 раз), дистиллированной водой до полного удаления щелочи, 1—2М соляной кислотой (3—5 раз) и дистиллированной водой до нейтральной реакции. В результате катионит переходит в H^+-форму. Чтобы перевести катионит в требуемую катионную форму, его промывают раствором соответствующего гидроксида или соли. Избыток реагента вымывают водой. В процессе промывки водой слабокислотного катионита происходит частичный гидролиз



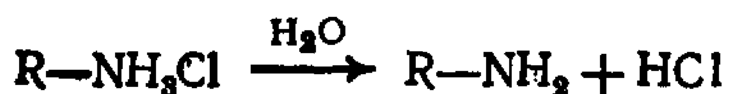
$$—COONa + H_2O \rightleftharpoons —COOH + NaOH$$

поэтому постоянно элюируется слабый раствор щелочи и элюат имеет слабую щелочную реакцию. В результате в данном случае длительная промывка водой бесполезна. Для полного перевода такого катионита из H^+-формы в солевую требуется много времени; приходится в течение суток и даже дольше выдерживать ионит в растворе основания.

Предварительную обработку анионита можно проводить следующим образом. Сначала анионит промывают несколько раз 1—2М соляной кислотой (или какой-либо другой сильной кислотой* соответствующей концентрации), далее водой до полного удаления кислоты, 1—2М раствором гидроксида натрия (приготовленного с использованием предварительно прокипяченной воды) и, наконец, кипяченой дистиллированной водой до полного удаления щелочи. При проведении двух последних стадий нужно закрыть доступ к иониту углекислого газа из атмосферы. На этих стадиях анионит переводится в OH^--форму и поэтому может абсорбировать CO_2. Анионит в OH^--форме не следует долго хранить. Сильноосновные аниониты более устойчивы в солевой форме. В эту форму их переводят, промывая раствором соответствующей кислоты или ее соли, избыток реагента вымывают водой. Соли слабоосновных анионитов не слишком устойчивы в процессе промывки водой и могут частич-

* Азотная кислота и другие кислоты-окислители для такой обработки, как правило, непригодны.

но разлагаться:



$$R{-}NH_3Cl \xrightarrow{H_2O} R{-}NH_2 + HCl$$

Аналитически чистые иониты предварительной обработке не подвергают; такому иониту достаточно дать набухнуть и затем возможно скорее перевести в нужную форму. Однако полностью регенерировать ионит можно, только проведя весь цикл предварительной обработки.

5.6.5. ВЫБОР БУФЕРОВ И БУФЕРИРОВАНИЕ ИОНИТОВ

При проведении ряда анализов пользуются катионитами в H^+-форме и анионитами в OH^--форме, буферировать их при этом не требуется. При работе с ионитами в солевой или смешанной форме (H^+ и соль или OH^- и соль) получить требуемые величины pH и ионной силы без буферирования не удается. Этого можно достичь, приведя ионит в равновесие с буферным раствором. Рекомендуемые общие принципы выбора буферных растворов и характеристики последних даны в табл. 5.9. Однако этим принципам следуют не всегда. В литературе можно встретить описания успешных хроматографических разделений, в которых применялись буферные растворы с градиентом концентрации, противоположным рекомендованному, но при этом могут отмечаться нерегулярности в ходе запланированного градиента. Характеристика буферных растворов в некоторых ра-

Таблица 5.9

Выбор типа буферного раствора для ионообменной хроматографии

	Условия разделения на	
	катионите	анионите
Концентрация буферного раствора, М	Соответствует катионному компоненту	Соответствует анионному компоненту
Не связанный с ионитом буферный компонент	Анионный	Катионный
Примеры состава	Ацетаты, барбитураты, цитраты, глицин, малеаты, малонаты, фосфаты и т. п.	Соли алкиламинов, аммиак, этаноламин, барбитуровые кислоты (pH<7,5), этилендиамин, имидазол, пиридин и его производные, трисбуфер и т. п.
Градиент pH	Возрастающий	Убывающий
Градиент концентрации	Возрастающий	Возрастающий

ботах не соответствует приведенной в табл. 5.9, и это может приводить к ошибкам при попытках воспроизвести эксперимент. При выборе буферных растворов следует в первую очередь учитывать состав и характер хроматографируемых соединений, а также возможные их взаимодействия с буферными растворами (например, образование комплексов с неорганическими ионами). Кроме того, нужно учитывать возможные трудности при детектировании разделенных соединений (спектрофотометрическое детектирование) и отделении их от буферных растворов. Таким образом, рекомендации могут носить лишь довольно общий характер.

Согласно общему методу буферирования, ионит в H^+- или OH^--форме смешивают с первым элюирующим буфером. В результате катионит становится более кислым, а анионит более основным. После этого постепенно добавляют к катиониту буферную кислоту, а к аниониту буферное основание до тех пор, пока pH смеси не станет равным pH стартового буфера. После добавления каждой порции раствора следует выждать, пока установится равновесие (время от времени перемешивая раствор), и измерить pH жидкого слоя над ионитом или pH фильтрата. После установления требуемой величины pH необходимо несколько раз промыть ионит элюирующим буферным раствором сначала методом декантации, а затем в колонке до тех пор, пока pH и электропроводность элюата не станут равными соответствующим характеристикам элюента. Последнее измерение следует проводить после длительного, лучше всего в течение ночи, выдерживания буфера в колонке. Только после этого можно считать, что ионит в колонке находится в равновесном состоянии.

Согласно другой методике, вместо титрования проводится длительная декантация или промывка на воронке с фильтром из пористого стекла. Начинают этот цикл обработки с ионита в солевой форме с подходящим противоионом, например в Na^+- или Cl^--форме. В эту форму легко перевести любой ионит, для этого достаточно многократной его промывки 2М или более концентрированным раствором соответствующей соли (в рассматриваемых здесь случаях раствором хлорида натрия). Выбранный ионит промывают декантацией с отсасыванием рядом буферных растворов, содержащих выбранный противоион. Растворы этого ряда должны быть одного типа, иметь одно и то же значение pH и различаться лишь концентрациями. В первом случае это могут быть 1, 0,5, 0,1, и 0,05 М и т. д. растворы натриевой соли, причем концентрация последнего раствора должна быть такой же, как и у элюирующего буферного раствора. Во втором случае это могут быть 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01 М и т. д. растворы хлорид-иона; причем концентрация последнего

раствора должна быть равна концентрации элюирующего буферного раствора. После многократной промывки декантацией последним буферным раствором взвесь ионита в этом растворе вводят в колонку и промывают до тех пор, пока pH и электропроводность элюента и элюата не станут одинаковыми.

Первая методика применима, если элюирующий буферный раствор отличается относительно низким pH в случае катионита и относительно высоким pH в случае анионита. Вторая методика пригодна в тех случаях, когда разделение ведется на ионите преимущественно в солевой форме.

5.6.6. РЕГЕНЕРАЦИЯ И ХРАНЕНИЕ ИОНИТОВ

Иониты не следует держать в колонках длительное время. Если колонка не используется, ионит следует извлечь из нее, регенерировать, т. е. удалить из него следы анализируемых соединений и буферных растворов. Наиболее общая методика регенерации — тщательная промывка ионита 2М растворами подходящих солей, например хлорида натрия, которые благодаря своей высокой ионной силе и высокой концентрации противоионов удаляют из ионита большинство остаточных ионов. Ионит переводят в Na^+- или в Cl^--форму и т. п. Невыведенные из ионита остаточные ионы удаляют из него при предварительной обработке (см. разд. 5.6.4). Ионообменные смолы, прошедшие предварительную обработку, фильтруют под вакуумом на воронке с фильтром из пористого стекла. Сушить их можно на воздухе, распределив слоем на плоской поверхности. Полное высушивание ионита при повышенных температурах или с использованием агентов-осушителей нежелательно, так как это приводит к повреждению его частиц.

Ионообменные целлюлозы или производные полидекстрана можно хранить непродолжительное время во влажном состоянии, если предварительно их регенерировали раствором хлорида натрия, содержащим консервирующий агент (табл. 5.10). Подлежащие более длительному хранению производные полидекстрана после регенерации следует промыть растворами спирта, постепенно увеличивая концентрацию спирта вплоть до 96%, и высушить на воздухе до полного удаления следов спирта. Зерна ионита при этом частично слипаются, но при последующем использовании они отделяются друг от друга.

Катиониты хранят в H^+-форме или в солевой форме, слабоосновные аниониты — в OH^--форме, а средне- и сильноосновные аниониты — в солевой форме. Не нужно забывать указывать на наклейке следующие сведения: *а)* тип ионита, *б)* название, *в)* степень сшивки, *г)* размер частиц, *д)* форму ионита, *е)* дату регенерации и фамилию экспериментатора, *ж)* номер последне-

Таблица 5.10

Консервирующие агенты для ионообменной хроматографии

Ионит	Агент	Концентрация раствора, %	Среда, в которой агент активен
Анионообменные производные целлюлозы и полидекстрана	Хибитан[R] (хлоргексидин)	0,002	Нейтральная, слабокислая и слабоосновная
	Фенилртутные соли	0,001	Слабоосновная
Ионообменные производные целлюлозы и полидекстрана	Хлоретон (трихлорбутанол)	0,05	Слабокислая
Ионообменные производные целлюлозы	Бутанол	Следы	Любая
	Тетрахлорметан	Следы	Нейтральная и слабокислая
	Хлороформ	Следы	Нейтральная и слабокислая
	Толуол	0,03	Любая
Катионообменные производные целлюлозы и полидекстрана	Азид натрия	0,02	Нейтральная и слабокислая и слабоосновная
Катионообменная смола[а]	Каприловая кислота	0,01	Слабокислая
	Пентахлорфенол[б]	0,0005	Слабокислая

[а] Для анализа аминокислот.

[б] Применяется в виде 0,5%-ного (об. %) раствора в 95%-ном этаноле.

го эксперимента с данным ионитом. Кроме того, желательно также записать номер закупленной партии ионита. Выполняя эти правила, вы сможете разумно расходовать дорогостоящий ионообменный материал; недостаточность сведений и плохое хранение приводят в конечном итоге к непроизводительному его расходованию.

Следует отметить, что при повторном использовании стиролдивинилбензольные смолы часто разрушаются и осколки зерен могут мешать анализу.

5.7. ХРОМАТОГРАФИЯ

5.7.1. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ КОЛОНКИ И ИХ ЕМКОСТЬ

Для ионообменной хроматографии пригодны разнообразные колонки: от самых простых, приготовленных самими хроматографистами из бюреток, до прецизионных колонок заводского изготовления со всем вспомогательным оборудованием (см. гл. 8). Наиболее распространенные типы колонок показаны на рис. 5.10; колонки других типов, пригодные для ионообменной

хроматографии, представлены на рис. 6.3 (гл. 6), а также на рис. 8.16—8.18 (гл. 8). Поскольку объем слоя набухшего ионита может меняться, не следует прижимать пробку вплотную к

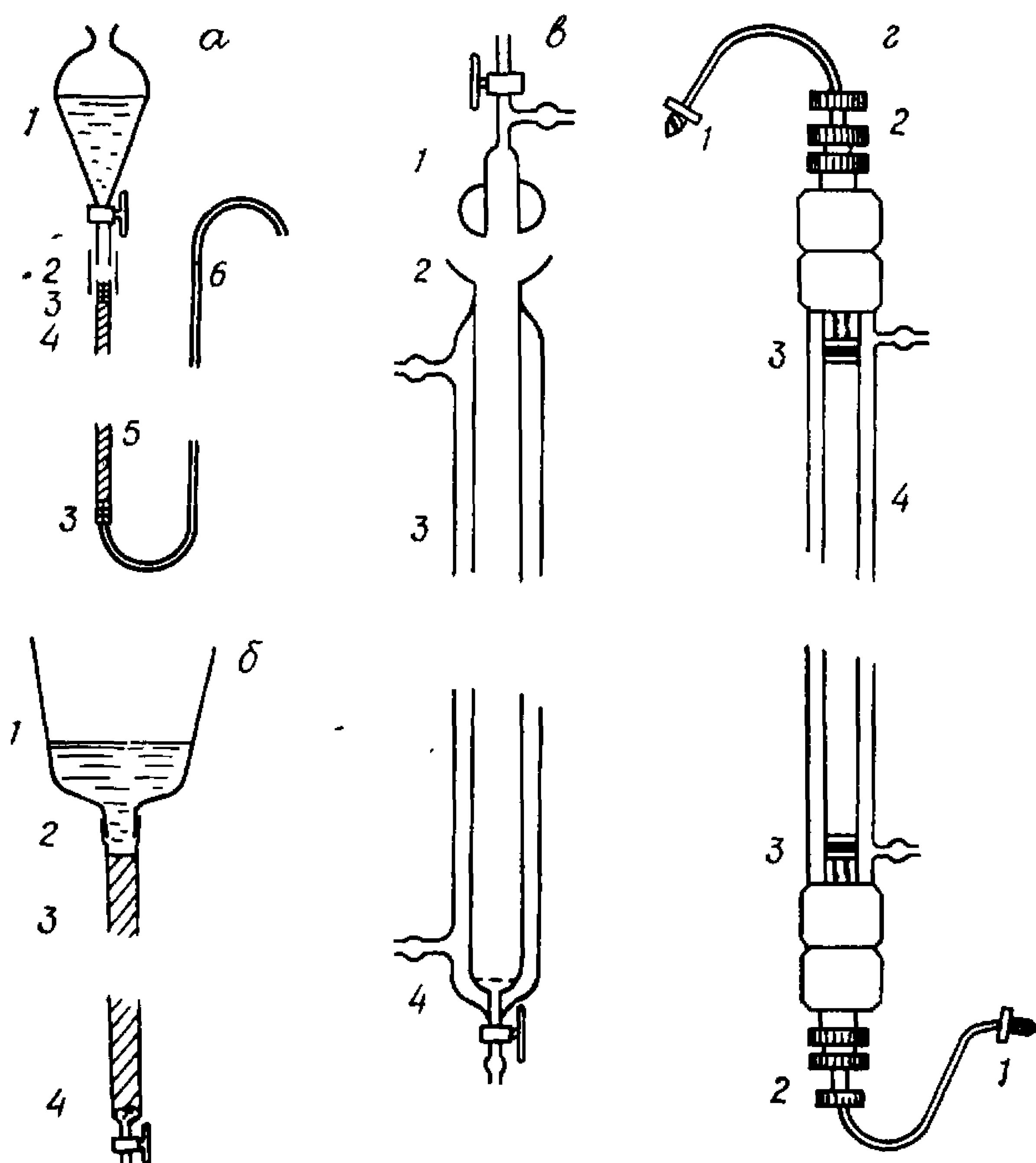


Рис. 5.10. Хроматографические колонки.

а) Простая микроколонка: *1* — делительная воронка; *2* — резиновое соединение; *3* — пробка из хлопковой ваты; *4* — ионит; *5* — стеклянная трубка, вытянутая в капилляр; *6* — капилляр, предотвращающий высыхание ионита;
б) аналитическая колонка для работы с неорганическими соединениями: *1* — удлинительная воронка; *2* — соединение на шлифах; *3* — ионит; *4* — пробка из стекловолокна;
в) простая препаративная колонка: *1* — удлинение со шлифом; *2* — сферическое шлифованное соединение; *3* — термостатируемая рубашка; *4* — пористое стекло;
г) колонка заводского изготовления для хроматографии при средних давлениях: *1* — винтовое соединение капиллярной трубки; *2* — винт для регулирования объема колонки с пористыми поршнями; *3*, *4* — термостатируемая рубашка.

слою. Над ним должно оставаться некоторое пространство, заполненное буферным раствором, иначе набухающий ионит может закупорить колонку или даже разорвать ее. Плотно закрывать слой ионита можно лишь при соблюдении специальных условий.

Если используется органический ионообменник, то размеры колонки выбирают, руководствуясь обычно следующими правилами: для нехроматографического применения отношение диаметра колонки к ее длине выбирают в пределах 1 : 5—1 : 10, для большинства простых хроматографических разделений — от

1 : 20 (чаще всего) до 1 : 50, а для некоторых специальных разделений — до 1 : 200 и даже менее. Для полидекстрановых ионитов оптимальная высота колонки составляет 20 см независимо от диаметра колонки; для производных целлюлозы применяют колонки высотой 5—15 см.

Определяя размеры колонки для данного эксперимента, следует учитывать ее емкость. Полный объем слоя ионита в миллилитрах умножают на величину емкости, взятую из табл. 5.4—5.7, и получают полную емкость колонки. Эта емкость полностью используется лишь в чисто ионообменных процессах. В хроматографических целях используется лишь часть этой емкости. В вытеснительной хроматографии обычно 1/4, максимально 1/2 полной емкости, в проявительной хроматографии — 5—10%, а в высокоэффективной аналитической хроматографии — около 1% полной емкости. В хроматографии белков на ионообменных производных целлюлозы и полидекстрана емкость колонки используется в более высокой степени — на 10—20%. При работе с этими ионитами удобно массовое отношение белка к сухому иониту, равное 1 : 10—1 : 2.

5.7.2. ЗАПОЛНЕНИЕ КОЛОНКИ ИОНИТОМ И КОНТРОЛЬ ЗА ПРИВЕДЕНИЕМ ИОНИТА К РАВНОВЕСИЮ

Для того чтобы обеспечить наилучший контакт ионита с элюентом, из зерен ионита необходимо удалить пузырьки воздуха. Делают это следующим образом: круглодонную колбу наполовину заполняют суспензией ионита в элюенте, откачивают из колбы воздух и помещают колбу в баню, температура которой примерно на 10 °С выше максимальной температуры хроматографирования. Когда давление в колбе достигает минимального предела, суспензия спокойно кипит. Спустя несколько минут характер кипения меняется: суспензия кипит толчками, что говорит о полном удалении из нее воздуха. Тогда откачивание прекращают и суспензию сливают по палочке в колонку. Такое удаление воздуха требуется лишь для точных хроматографических анализов, в других случаях подобную обработку ионита можно не проводить.

Способ заполнения колонки определяется типом ионита и размером его зерен, и, чем меньше размеры частиц, тем сложнее добиться равномерного заполнения колонки. Суспензию ионита (50—100 меш) наливают в колонку через воронку, на одну треть заполненную тем же элюентом, и дают жидкости медленно сливаться из колонки. Зерна ионита быстро оседают. Заполняя колонку ионитом с более крупными зернами, целесообразно время от времени постукивать по стенкам колонки. Это

ускорит осаждение и позволит получить более равномерный слой адсорбента. При заполнении колонки очень мелкими зернами постукивание не применяют. Ионитом с зернами размером 100—400 меш колонки заполняют методом осаждения. Для этого закрывают выходной конец колонки и на одну треть заполняют ее элюентом. Далее в колонку добавляют порцию густой суспензии ионита. Не дожидаясь осаждения этой порции, открывают выходное отверстие колонки и вводят в нее следующие порции суспензии, не допуская полного осаждения предыдущих порций. Это препятствует расслоению насадки и нарушению ее однородности.

Заполнение колонки еще более мелкими, плохо осаждающимися зернами ионита (менее 40 мкм) или просто мелкими, но неоднородными по размеру зернами производных целлюлозы (когда может происходить фракционирование зерен по размеру) можно ускорить, проталкивая густую суспензию в колонку потоком буферного раствора из удлинительной колонки. Скорость потока буферного раствора должна быть равна скорости перемещения подвижной фазы в процессе хроматографирования. Очень мелкие, неосаждающиеся зерна ненабухающих поверхностно-пористых или макропористых ионитов для жидкостной хроматографии высокого давления вводят в длинную колонку в сухом состоянии, слегка постукивая по стенкам колонки. Воздух между зернами удаляют из колонки, прокачивая через нее элюент под высоким давлением. Ионообменные производные полидекстрана вводят в виде жидкой, но не слишком разбавленной пасты в почти пустую колонку (1 см буферного раствора на дне колонки), закрытую снизу. Лучше при этом пользоваться удлинительной колонкой. После 10-минутного осаждения в колонку прекращают подавать суспензию и промывают ионит буферным раствором.

Очень важно, чтобы при заполнении колонки в нее не попадал вместе с суспензией воздух, поэтому суспензию наливают по палочке, касающейся внутренней стенки колонки. Необходимо также следить, чтобы слой ионита не высыхал, т. е. чтобы в уже приготовленную колонку не проникал сверху воздух. Поэтому над слоем ионита в колонке всегда должен быть слой элюента, причем этому слою можно дать просочиться в ионит лишь непосредственно перед вводом в колонку анализируемой пробы.

После заполнения колонку промывают первым элюентом или буферным раствором, с которым ионит приводят в равновесие, и сравнивают такие характеристики потоков элюента и элюата, как pH, электропроводность, поглощение в УФ- или в видимой области спектра или какие-то другие параметры, которые контролируются в ходе хроматографического процесса. Колонка го-

това к употреблению, когда величины соответствующих параметров элюента и элюата станут одинаковыми; см. также разд. 5.6.5.

5.7.3. ВВОД ПРОБЫ В КОЛОНКУ

Если все компоненты образца сорбируются на начальном участке колонки, откуда их затем десорбируют методом ступенчатого или градиентного элюирования, то в колонку можно вводить довольно разбавленную пробу, т. е. довольно большого объема. Пробу просто заливают или закачивают в колонку, после чего через нее пропускают первый элюент. Если же нельзя твердо сказать, что ни один компонент пробы не выйдет из колонки в процессе ввода пробы, то используют более концентрированную пробу (меньшего объема), которую вводят на слой или под слой элюента. Первая методика не требует специального оборудования, а вторую методику можно применять лишь при условии, что плотность раствора пробы заметно выше плотности элюента и раствор быстро оседает на дно слоя элюента.

При вводе пробы по первой методике поверх слоя ионита в колонке кладут кружок высококачественной фильтровальной бумаги, дают буферному раствору стечь и, когда уровень раствора в колонке сравняется с бумажным кружком, пипеткой вводят пробу в центр кружка. После того как проба впиталась (необходимо позаботиться о том, чтобы колонка «не высохла»), стенки колонки споласкивают по меньшей мере трижды небольшими порциями элюента из пипетки с изогнутым концом. Каждую последующую порцию добавляют лишь после того, как впитается предыдущая порция. Далее пространство над слоем ионита заполняют элюентом и начинают элюирование.

При вводе пробы под слой элюента также пользуются кружком из фильтровальной бумаги, на колонку при этом почти доверху заполняют элюентом. Концентрированный раствор пробы медленно вводят под слой элюента почти над самым бумажным кружком, используя для этого шприц с длинной иглой или небольшую закрепленную над колонкой делительную воронку с вытянутой в капилляр трубкой. В результате над ионитом образуется слой раствора пробы. Иногда плотность этого раствора увеличивают, добавляя в него сахар. Перед вводом пробы иглу шприца (или капилляр воронки) следует заполнить раствором пробы, причем так, чтобы в ней не было пузырьков воздуха. По завершении ввода иглу (капилляр) осторожно, стараясь не перемешать образовавшийся слой раствора пробы, вынимают из колонки. Колонку при необходимости доливают доверху дополнительным количеством элюента, и после этого можно начинать элюирование. Таким образом, эта

методика не требует длительного ополаскивания стенок колонки.

В некоторых колонках заводского изготовления входное отверстие закрыто мембраной, что позволяет вводить пробы шприцем в замкнутую область непосредственно у поверхности слоя ионита, не прерывая потока буферного раствора через колонку. В аналитической жидкости хроматографии при высоких давлениях и высоких скоростях потока подвижной фазы пробу вводят в устройство для ввода с помощью многоходовых кранов и капиллярных петель различной формы (см. гл. 8).

5.7.4. МЕТОДЫ ЭЛЮИРОВАНИЯ И СКОРОСТЬ ЭЛЮИРОВАНИЯ

Для *простого элюирования* (изократного элюирования) используют единственный элюент, причем обычно тот, в котором растворена анализируемая проба. Этот метод применяется в аналитической высокоскоростной жидкостной хроматографии, поскольку регенерация колонки при этом не требуется. Чтобы результаты разделения были удовлетворительными, его проводят в длинных колонках. В отдельных случаях этот метод применяют и как препаративный.

Ступенчатое элюирование ведут элюентами более сильными, чем тот, в котором растворена анализируемая проба. Если колонка заполнена катионитом в H^+-форме, концентрация H^+-ионов должна быть более высокой, а для хроматографии на анионите в солевой форме необходима более высокая концентрация других противоионов в элюирующих буферных растворах. Для

Таблица 5.11.

Общие условия сорбции и десорбции соединений на органических ионитах

Тип и форма ионита	Сорбция	Десорбция
Сильнокислотный катионит в H^+-форме	Водный раствор, очень разбавленная или слабая кислота	Высокая концентрация кислоты или сильная кислота
Сильнокислотный катионит в смешанной форме (соль+H^+)	Малый pH и малая ионная сила буферного раствора	Высокий pH или высокая ионная сила буферного раствора или то и другое вместе
Сильноосновный анионит в OH^--форме	Водный раствор, очень разбавленное или слабое основание	Высокая концентрация основания или сильное основание
Сильноосновный анионит в смешанной форме (соли+OH^-)	Высокий pH и малая ионная сила буферного раствора	Малый pH или высокая ионная сила или то и другое вместе

Таблица 5.12

Скорости элюирования в ионообменной хроматографии

А. Линейная скорость

Область применения	Размер зерен, мкм	Длина колонки, см	Избыточное давление, атм	Скорость потока, мл·см$^{-2}$·мин$^{-1}$ (или см/мин)
Анализ неорганических соединений	75—150			2
Хроматография аминокислот	15—20 10—15	50 7	17,7—20,4 2,0—2,7	3 3
Хроматография пептидов	10—15	18	3,4	1
Хроматография сахаров	10—20	55	20,4	2
Хроматография нуклеозидов	15—20	19	0,4—1,1	1
Высокоскоростная жидкостная хроматография нуклеозидов	5—10 3—72	25 25	68 327	10 30

Б. Объемная скорость

Область применения	Размер зерен, мкм	Скорость потока, мл·см$^{-2}$·мин$^{-1}$
Верхний предел	150—500	0,5
Неравновесный ионный обмен	150—500	0,5—1
Препаративная хроматография	150—500	0,005—0,05
Анализ неорганических соединений	75—150	0,1—0,5
Высокоэффективная хроматография	40—75	0,003—0,02
Высокоскоростная жидкостная хроматография[a]	30—20	0,1—1,0

[a] Поверхностно-пористые ионообменники, толщина слоя примерно 1 мкм.

разделения на анионите в OH^--форме используют элюенты с возрастающей концентрацией OH^--ионов, для разделения на анионите в солевой форме — элюенты с возрастающей концентрацией других противоионов. Ионную силу можно повысить, добавляя в элюент нейтральные электролиты, чаще всего хлорид калия или натрия, при неизменной концентрации буферного раствора. Общие условия сорбции и десорбции на ионитах указаны в табл. 5.11.

При *градиентном элюировании* состав элюента непрерывно меняется (см. разд. 1.3.3), однако общие принципы остаются

теми же (табл. 5.11). Оборудование для градиентного элюирования описывается в разд. 8.3. Формулы для вычисления градиентов приведены в работах [111а, 119, 120]. Для ионообменной хроматографии, как правило, наиболее удобен линейный градиент концентрации; поскольку для него не требуется специальных расчетов, удобен также и вогнутый градиент (кривые *1* и *2* на рис. 1.10).

Скорость элюирования зависит от способа использования ионита и от размера его зерен. Ее выражают либо как *линейную* (мл·см$^{-2}$·ч$^{-1}$=см/ч или мл·см$^{-2}$·мин$^{-1}$=см/мин), либо как *объемную* (мл·см$^{-3}$·мин$^{-1}$). Линейная скорость относится к площади поперечного сечения колонки, а объемная — к объему слоя ионита. *Полную скорость потока* определяют числом миллилитров раствора, выходящего из колонки за единицу времени. Скорость элюирования зависит от вязкости раствора, которой определяется диффузия в зерна ионита и которая уменьшается с повышением температуры раствора. Чем мельче частицы ионита и чем выше температура, тем более высокие скорости потока допустимы в колонке. Однако по мере уменьшения размеров частиц увеличивается гидродинамическое сопротивление колонки, а повысить температуру не всегда возможно. Поэтому при работе с тонкоизмельченными ионообменными смолами всегда необходимо повышенное давление. Сопротивление колонки зависит от формы частиц ионита; сферические частицы оказывают наименьшее сопротивление потоку подвижной фазы. При использовании мягких ионитов на основе полидекстрана или целлюлозы высокие давления недопустимы. В табл. 5.12 показаны скорости потока подвижной фазы в колонках, заполненных различными ионитами. Для ионообменных производных целлюлозы допустимы скорости потока от 4 до 30 мл·см$^{-2}$·ч$^{-1}$, а иногда и до 50 мл·см$^{-2}$·ч$^{-1}$. Чем больше по размеру хроматографируемые макромолекулы, тем меньше должна быть скорость потока. Перепад давлений на колонках, заполненных сефадексом А-50 и G-50, не должен превышать 2 см водяного столба на 1 см длины колонки.

5.7.5. РАЗМЕР ОТБИРАЕМЫХ ФРАКЦИЙ И АНАЛИЗ ФРАКЦИЙ

Размеры отбираемых фракций элюата зависят не только от размеров колонки, объемов элюирующих растворов и ожидаемого числа хроматографических зон и их ширины, но и от метода детектирования. Так, например, если фракции автоматически отбираются насосом для УФ-спектрометрического детектирования, то их объем должен составлять не менее 3—4 мл. При использовании других методов детектирования минималь-

ный объем отбираемых фракций может быть меньше, например 0,5—1 мл. Максимальный объем фракций определяется объемом фракций и обычно не превышает 0,25—1 л. Для разделения очень больших проб сборник фракций нужно специально переделывать (разд. 8.6). Чаще всего работают с фракциями объемом 5—20 мл, которые легко отбирать с помощью почти всех известных автоматических сборников фракций. Обычно элюент делят на 30—200 фракций в зависимости от сложности разделяемой смеси. Делить элюат на слишком большое число фракций не имеет смысла, однако при малом числе фракций хорошо разделенные компоненты могут перемешиваться.

Выбор методики анализа фракций определяется природой анализируемого материала; причем выбрать методику анализа, а в некоторых случаях и испытать необходимо перед началом хроматографирования. Применяют физические, химические и биологические методики. Чаще всего измеряют показатель преломления. Пользуются также различными колориметрическими методами, а также тонкослойной или бумажной хроматографией и электрофорезом. Идеальным способом является детектирование радиоактивных изотопов. Измеряя pH и электропроводность отбираемых фракций, можно контролировать условия элюирования. Именно такой контроль позволяет воспроизводить условия градиентного элюирования. В ряде случаев очень полезно комбинировать несколько методов детектирования. Полезны также непрерывное автоматическое детектирование (с достаточно высокой чувствительностью) разделенных соединений и регистрация хроматограмм (см. разд. 8.6, 8.7). Результаты измерений записывают в виде кривой зависимости измеряемой величины от объема элюата или номера фракции. Исходя из распределения пиков на хроматограмме некоторые фракции можно объединить. При этом необходимо следить, чтобы объединялись совершенно чистые фракции, не содержащие примесей других компонентов, иначе потребуется повторное хроматографирование. Фракции, предназначенные для количественных анализов, хранят в темноте и на холоду с тем, чтобы не допустить нежелательных реакций. Фракции соединений, окисляющихся на воздухе или поглощающих диоксид углерода, следует хранить в герметически закрытых сосудах.

5.7.6. ПЕРЕСЧЕТ ПАРАМЕТРОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РАЗНЫХ КОЛОНОК

Довольно часто результаты, полученные на различных колонках, требуется пересчитывать с учетом размеров колонок, имеющихся в распоряжении исследователя. По площадям по-

перечного сечения сравниваемых колонок рассчитывают объем элюента, полную скорость его потока в колонке и объем отбираемых фракций. Высота колонки и число отбираемых фракций должны быть такими же, как и в исходном эксперименте. Если выполнять перечисленные условия, то при градиентном или ступенчатом элюировании на новой колонке содержание фракций останется таким же, как и при разделении на исходной колонке. Можно надеяться, что расположение пиков на хроматограмме также окажется аналогичным.

Если требуется изменить высоту колонки или если в оригинальной работе не приведены ни площадь поперечного сечения, ни диаметр колонки, то в вычислениях следует опираться на соотношение объемов слоя ионита в описанной и новой колонках; основываясь на этом соотношении, можно вычислить объемы элюентов, полную скорость потока и объем отбираемых фракций (при одном и том же их числе). Однако воспроизвести результаты можно лишь при одинаковой высоте исходной и новой колонок, поскольку ход элюирования зависит и от этого параметра.

В связи с этим для предварительных экспериментов следует выбирать колонку такой высоты, которая может оказаться приемлемой даже при большем объеме колонки. Распространенные ошибки при вычислении параметров удерживания связаны с тем, что не учитываются мертвые объемы (верхняя часть колонки, объемы соединений); хроматографические пики при этом оказываются немного смещенными относительно вычисленных положений. Поэтому лучше всего стремиться к уменьшению мертвых объемов в хроматографической системе.

5.8. ПРИМЕРЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИОНИТОВ ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ СМЕСЕЙ НЕОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

М. ГЕЙТМАНЕК

5.8.1. НЕХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

Благодаря своему малому размеру неорганические ионы обмениваются гораздо быстрее, чем органические, и потому для их разделения пригодны иониты с частицами большего размера. Разделение можно осуществить путем простой сорбции и элюирования, однако чаще для хроматографического разделения и элюирования неорганических ионов применяют комплексообразующие реагенты. Катионы можно удерживать на катионитах и затем элюировать в виде комплексов с ЭДТА, цитратом, фос-

фатом и т. п. или переводить в анионные комплексы и сорбировать на анионитах. Комбинируя эти методы, можно разделять разнообразные смеси катионов. Ионный обмен — простой и эффективный метод исключения мешающих ионов в обычных аналитических процессах.

УМЯГЧЕНИЕ ВОДЫ

Это наиболее старая и наиболее широкая область применения ионитов. Жесткость воды, как известно, обусловлена присутствием в ней Ca^{2+}, Mg^{2+} и других многозарядных ионов. Чтобы умягчить природную воду, ее пропускают сквозь слой катионита, связывающего перечисленные ионы. На катионите происходит ионный обмен, в результате которого высвобождается соответствующее количество ионов натрия, так что полная соленость воды остается неизменной. Содержащиеся в воде анионы свободно проходят через катионит. Многозарядные катионы преимущественно удерживаются из разбавленных растворов, поскольку у них коэффициент распределения выше, чем у иона натрия, и сильнее сродство к катиониту. Чтобы регенерировать колонку с катионитом, т. е. перевести катионит в Ca^{2+}-формы вновь в Na^{+}-форму, ее следует промыть избытком концентрированного раствора хлорида натрия.

ДЕМИНЕРАЛИЗАЦИЯ ВОДЫ

Ионный обмен используют также для полного удаления из водных растворов катионов и анионов, исключая находящиеся в равновесии ионы H^{+} и OH^{-}. С этой целью раствор сначала пропускают через колонку с сильнокислотным катионитом в H^{+}-форме, на котором в результате обмена с H^{+} удерживаются все катионы. Далее полученный раствор пропускают через вторую колонку с сильноосновным анионитом в OH^{-}-форме. На нем удерживаются анионы не только сильных, но и слабодиссоциированных кислот, например кремневой, угольной и борной. В результате такой обработки получают деминерализованную воду с высоким удельным электрическим сопротивлением. Этим методом можно значительно повысить качество дистиллированной воды; однако, обрабатывая воду таким способом, необходимо следить за содержанием в воде органических соединений, поскольку с течением времени и особенно под воздействием кислорода иониты разрушаются. Деминерализацию ведут в двух колонках объемом 5—10 л, соединенных так, чтобы вода в них поступала снизу, иначе накапливающийся воздух будет тормозить поток. Оборудование для лабораторной обработки воды изготавливается рядом фирм. В процессе работы с ионитом и

при его регенерации необходимо следовать советам изготовителя. Для деминерализации применяют и специальным образом обработанные одиночные колонки, содержащие смесь катионита в H^+-форме и анионита в OH^--форме. На таком смешанном ионообменном слое (монослойный процесс) деминерализация раствора не сопровождается изменением его pH. Однако смешанный слой труднее регенерировать, поскольку для этого необходимо сначала отделить анионит от катионита методом флотации в потоке воды.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ СОЛЕЙ

Определение полной концентрации солей [163] безотносительно к типу ионов — одна из первых областей применения ионитов. При пропускании анализируемого раствора через колонку с катионитом в H^+-форме в результате обмена катионами высвобождается эквивалентное количество ионов водорода, которое можно определить методом алкалиметрии.

Аликвотную часть анализируемого раствора, содержащую около 3 мэкв. электролита в 50 мл, наливают в резервуар, помещенный над колонкой с ионитом. В этих целях можно использовать колонку, показанную на рис. 5.10, с насадкой из 15 мл сильнокислотного катионита (например, остион KS, 0,15—0,3 мм), предварительно переведенного в H^+-форму и тщательно промытого водой. Элюат, вытекающий из колонки со скоростью 1—2 мл/мин, собирают в колбе для титрования. После того как весь раствор пройдет через колонку (важно, чтобы при этом была использована лишь часть емкости колонки), стенки резервуара и колонку промывали 100 мл воды. Весь собранный элюат титруют 0,1М раствором гидроксида натрия в присутствии метилового оранжевого. Далее титруют вторую аликвотную часть анализируемого раствора, которую не пропускали через колонку, и вычитают полученное значение концентрации из первоначально полученной величины. Регенерируют колонку 200 мл 4М соляной кислоты, промывают водой до нейтральной реакции элюата. После этого колонка вновь готова к работе.

Недавно введен радиоактивный метод индикации [19].

Подобным способом можно определить полную концентрацию анионов в растворе. Пропущенный через колонку с анионитом в OH^--форме раствор титруют стандартным раствором кислоты. Однако этот способ не столь удобен, поскольку элюат имеет щелочную реакцию и может содержать диоксид углерода из воздуха; кроме того, если в растворе содержится какая-либо соль аммония, возможны потери аммиака. Ионы металлов могут осаждаться в колонке в виде нерастворимых гидрокси-

дов. Кроме того, выбрать подходящий анионит достаточно сложно. Тем не менее этим способом получают стандартный раствор гидроксида натрия, не содержащий карбоната [197]. Колонку размером 1,8×60 см заполняют сильноосновным анионитом амберлит IRA-400. Анионит переводят в OH^--форму, регенерируя его 2 л 1М раствора гидроксида натрия, приготовленного разбавлением 18М раствора гидроксида натрия, с тем чтобы в нем не содержался карбонат. После этого колонку промывают 2 л свежевскипяченной и охлажденной дистиллированной воды до нейтральной реакции элюата. Далее через колонку пропускают со скоростью 4 мл/мин раствор 2,922 г хлорида натрия (аналитически чистого) в 50—100 мл этой воды. Колонку промывают водой, собирают элюат в мерной колбе объемом 500 мл и разбавляют раствор водой до метки. Колбу закрывают трубкой с поглотителем CO_2. Концентрация полученного раствора очень хорошо согласуется с ее теоретическим значением.

ИСКЛЮЧЕНИЕ МЕШАЮЩИХ ИОНОВ

С помощью ионитов проводят такую важную операцию, как удаление нежелательных компонентов из растворов. Определению фосфата мешают ионы кальция, железа(III) и алюминия, но их можно исключить, пропуская анализируемый раствор через слой сильнокислотного катионита в H^+-форме [64]. С этой целью колонку заполняют 15 мл дауэкса 50 (H^+-форма 0,07—0,15 мм), тщательно промытого водой. Пробу (0,4 г) природного фосфата разлагают 30-минутным кипячением с 12М соляной кислотой. Полученный раствор выпаривают досуха, остаток высушивают в печи с тем, чтобы осадить кремневую кислоту и разложить соединения фтора. После этого остаток обрабатывают 2 мл 6М соляной кислоты и 20 мл воды, отфильтровывают нерастворившиеся вещества и, промывая фильтр водой, доводят объем фильтрата до 65 мл. Полученный раствор вводят в колонку с катионитом со скоростью 5 мл/мин и элюируют водой, доводя объем элюата до 150 мл. Содержание в элюате кислоты определяют потенциометрическим титрованием 0,1М раствором гидроксида натрия.

Другой пример исключения — отделение большого избытка обычных металлов от небольшого количества платиновых металлов и золота. Последние превращают в устойчивые отрицательно заряженные хлоридные комплексы, которые проходят через колонку с катионитом, не удерживаясь в ней [231]. Пробу сплава (35 г) разлагают смесью соляной и азотной кислот. Избыток азотной кислоты удаляют выпариванием, остаток растворяют в 8 мл 12М соляной кислоты и постепенно доводят

объем раствора до 1,5 л. Полученный раствор, pH которого должен быть равен 1,2—1,5, вводят в колонку с катионитом дауэкс 50 (0,3—0,8 мм) в H^+-форме. Поскольку количество сорбируемых ионов достаточно велико, разделение проводят на колонке большого объема (70×4 см), заполненной 700 г влажной смолы. Скорость потока устанавливают равной 25 мл/мин. Колонку промывают водой, после чего pH элюата вновь доводят до 1,5, добавляя в него разбавленную соляную кислоту. В результате такого разделения из пробы удаляется основная часть обычных металлов. Чтобы удалить оставшиеся ионы обычных металлов, элюат повторно разделяют на колонке меньших размеров. Элюат выпаривают досуха, добавив предварительно к нему 3 мл 2%-ного раствора хлорида натрия. Остаток растворяют в 30 мл воды и вновь доводят pH раствора до 1,5. Раствор пропускают через колонку размером 4×1 см, заполненную тем же ионитом, но с частицами меньшего размера. Колонку промывают водой, подкисленной соляной кислотой до pH 1,5. Элюат выпаривают досуха, добавив к нему предварительно небольшое количество хлорида натрия. Органические соединения, попавшие в раствор из ионообменной смолы, разлагают, обрабатывая раствор концентрированной азотной кислотой и пероксидом водорода. После выпаривания в присутствии соляной кислоты получают чистые хлориды платиновых металлов и золота.

НАКОПЛЕНИЕ СЛЕДОВЫХ ИОНОВ

Если необходимо разделить компоненты, концентрация которых очень мала, можно воспользоваться весьма высоким сродством комплексообразующих ионитов к переходным металлам. При этом можно очистить основной компонент от следовых примесей и более точно определить состав примеси после ее элюирования из колонки. Примером может служить концентрирование следов меди из 1М раствора хлорида аммония на хелатирующем ионите дауэкс А-1 [214]. Для сорбции 10^{-4}% меди ($1{,}58 \cdot 10^{-5}$ г.-ион Cu^{2+}/л) из 1 л 1М раствора хлорида аммония этот раствор пропускали со скоростью 3 см/мин через колонку размером 0,94 $см^2$×1,3 см, заполненную 1 мл дауэкса А-1 в NH_4^+-форме. Медь элюировали из колонки 10 мл 1М соляной кислоты и определяли титрованием 0,01М раствором ЭДТА. Степень удерживания меди превышала 99%.

5.8.2. ХРОМАТОГРАФИЯ КАТИОНОВ

Хроматографическое разделение катионов, не образующих комплексы, может быть основано на различиях их констант распределения при сорбции на катионитах. При надлежащем

выборе ионита (в частности, его формы), элюента и условий элюирования можно с успехом осуществить ряд различных операций, например разделение щелочных и щелочноземельных металлов.

ЩЕЛОЧНЫЕ МЕТАЛЛЫ

Навеску силиката (1 г) разлагают в платиновом тигле смесью кислот, содержащей плавиковую кислоту. Далее из пробы исключают железо и алюминий, осаждая их избытком оксида кадмия. Осадок отфильтровывают и аликвотную часть фильтрата вводят в колонку (2,4 см^2×27 см), заполненную сильнокислотным катионитом дауэкс 50 (0,12 мм). Предварительно катионит следует перевести в H^+-форму, пропуская через него соляную кислоту, и промыть водой. При элюировании 0,7*М* соляной кислотой со скоростью 0,6 см/мин с первыми 130 мл элюата из колонки выходит кадмий, со следующими 50 мл — литий, со следующими 60 мл — натрий, затем выходит около 90 мл чистой кислоты и, наконец, с последними 100 мл элюата из колонки выходит калий. При дальнейшем элюировании более концентрированной кислотой из колонки выходят магний и кальций, после чего колонку можно повторно использовать. Этот способ требует меньше времени, чем классический метод, а точность у него по крайней мере такая же [198].

Для разделения щелочных металлов успешно применяли неорганические иониты, например сурьмяную кислоту [1]. На колонке (0,8×6 см), заполненной сурьмяной кислотой (0,07—0,15 мм), можно разделить все щелочные металлы. Раствор, содержащий 10^{-5} г.-ион Li^+, 10^{-4} г.-ион Na^+ и по $4\cdot10^{-5}$ г.-ион K^+, Rb^+ и Cs^+, вводят в колонку и элюируют со скоростью 0,6 мл/мин азотной кислотой возрастающей концентрации. Содержащиеся в пробе ионы элюируются в такой последовательности: Li^+ с первыми 40 мл 1*М* азотной кислоты, K^+ с 140 мл 2*М* кислоты, Cs^+ со 120 мл 4*М* кислоты, Rb^+ с 100 мл 6*М* кислоты и, наконец, Na^+ с 200 мл 5*М* раствора нитрата аммония. При этом получаются отчетливые хроматографические пики, только у пика натрия наблюдается небольшой «хвост». Другие примеры разделения катионов на неорганических ионитах описаны в работе [114].

ИОНЫ ЩЕЛОЧНОЗЕМЕЛЬНЫХ МЕТАЛЛОВ И ДРУГИЕ КАТИОНЫ

Смесь (1 : 10) кальция и бария разделяли на колонке (1,4×20 см), заполненной сильнокислотным катионитом дауэкс 50X8 (H^+-форма, 0,15—0,30 мм) [116]. Сначала смесь нит-

ратов кальция и бария, содержащую 10 мг кальция и избыток бария, сорбируют в колонке с катионитом. Кальций количественно элюируют из колонки 200 мл 1М раствора ацетата аммония. Для элюирования бария используют такой же объем более концентрированного элюента, например 4М раствор ацетата аммония. В разделенных фракциях кальций определяют в виде оксалата, а барий — иодометрическим.

Разделение на катионитах смесей простых катионов поливалентных металлов, в том числе и редкоземельных, основанное лишь на различиях в сродстве, обычно неэффективно, если каким-либо способом не усилить эти различия. Чаще всего используют различные реакции комплексообразования (разд. 5.8.4).

5.8.3. ХРОМАТОГРАФИЯ АНИОНОВ

Работ по ионообменной хроматографии анионов существенно меньше, чем работ по хроматографии катионов. Разделение анионов, как правило, проводят, используя различие в сродстве анионов к анионитам и реже — различие в силе кислот. Классическим примером может служить разделение галогенидов на сильноосновном анионите с нитратом натрия в качестве элюента [36]. Это разделение ведут на колонке (3,4 см^2×6,7 см), заполненной сильноосновным анионитом дауэкс 1-Х10 (0,07—0,15 мм). Промывая колонку 0,5М раствором нитрата натрия, из нее удаляют хлорид-ионы. Суммарное содержание галогенидов в пробе должно быть не менее 6 мэкв., например по 2 мэкв. хлорида натрия, бромида и иодида калия. Пробу рас-

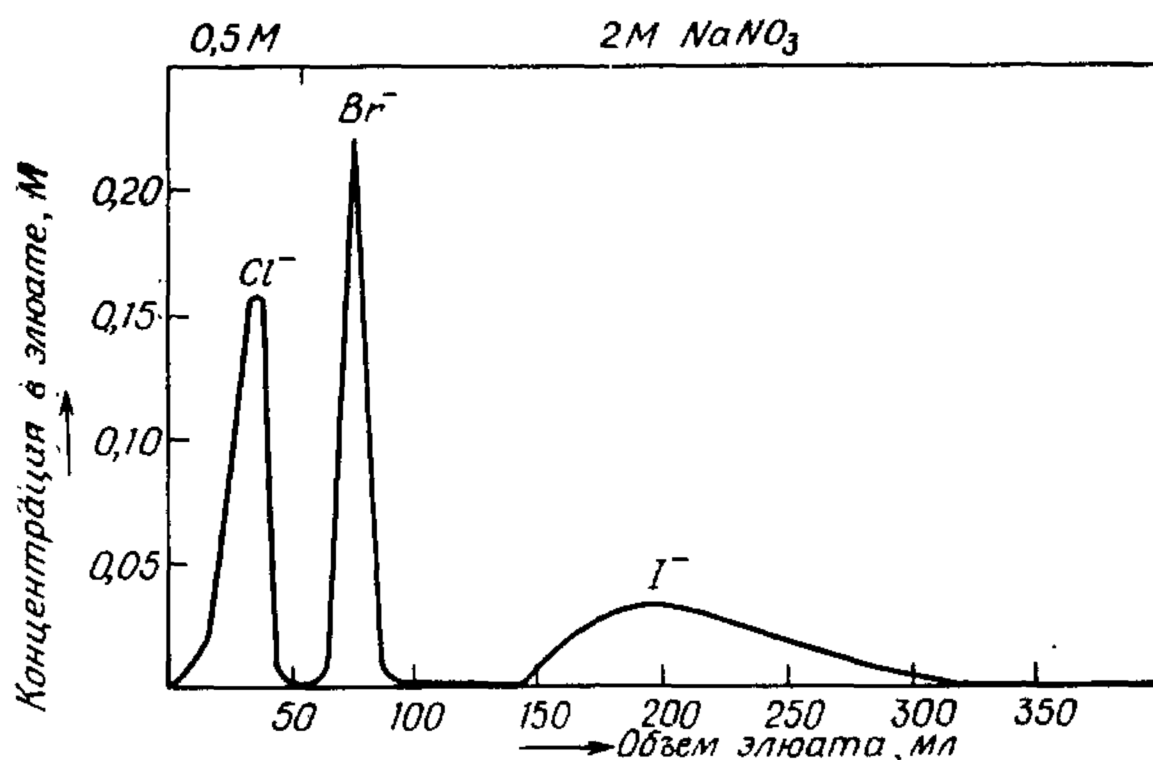


Рис. 5.11. Кривые элюирования хлоридов, бромидов и иодидов [36].

Колонка 3,4 см^2×6,7 см; сильноосновной анионит дауэкс 1-Х10 (70—150 мкм); элюенты — 0,5 М раствор $NaNO_3$ (Cl^-) и 2 М раствор $NaNO_3$ (Br^- и I^-) при скорости потока 1 мл/мин.

творяют в 2 мл 0,5М раствора нитрата натрия. Этот же раствор используют и для смывания пробы в колонку, и в качестве первого элюента. Скорость потока устанавливают равной 1 мл/мин. Собирают первые 55 мл элюата, содержащие хлорид. После этого элюент заменяют на 2М раствор нитрата натрия и отбирают фракцию объемом 55 мл, в которой содержится бромид. С третьей фракцией объемом 260 мл элюируется иодид. Определять галогениды можно аргентометрически. Полученная при таком разделении хроматограмма представлена на рис. 5.11. По окончании разделения колонку промывают 100 мл 0,5М раствора нитрата натрия, после чего она готова к дальнейшему использованию. Аналогичный принцип положен в основу описанной в работе [21] методики разделения смесей хлорида (до 1 мг) и иодида при 100-кратном избытке последнего. Это разделение проводят на колонке с сильноосновным ионитом, элюируя пробу 2М раствором нитрата калия; обнаружение осуществляют меркуриметрическим методом.

При определении фторида в ряде природных материалов необходимо предварительно избавиться от мешающих ионов, главным образом от избытка фосфата [233]. С этой целью пробу пропускают через колонку с сильноосновным ионитом дауэкс 1-X10 (0,07—0,15 мм). Сначала ионит трижды обрабатывают 100 мл 3М раствора гидроксида натрия и 3М соляной кислоты. После обработки ионит оставляют в OH^--форме, промывают водой и помещают в колонку размером $1 \times 10{,}5$ см. В эту колонку вводят смесь 0,5 мл раствора NaF, содержащего 25 мкг F^-, 0,5 мл раствора KH_2PO_4, содержащего 12,5 мг P (F : P равно 1 : 500), и 1 мл раствора, содержащего радиоактивный изотоп ^{32}P (25 мкКи). Предварительное градиентное элюирование, проведенное с целью десорбции фторида, показало, что элюирование лучше всего вести 0,5М раствором гидроксида натрия. Элюент пропускают через колонку со скоростью 8—9 капель/мин, объем отбираемой фракции составляет 6 мл (120 капель). Количественное элюирование фторида происходит в фракциях *7*—*9* (10,0, 12,3 и 2,5 мкг фторида), а радиоактивный изотоп фосфора впервые появляется в фракции *29*.

Хроматография анионов оказалась эффективным методом разделения некоторых сложных смесей, например политионатов, когда элюирование из колонки с сильноосновным анионитом удобно вести соляной кислотой различной концентрации [84]. Успешным оказалось и разделение конденсированных фосфатов с использованием для элюирования раствора хлорида калия с добавкой формиатного буферного раствора; эта методика рекомендована для серийных анализов смачивающих реагентов [113].

5.8.4. ИОННЫЙ ОБМЕН С УЧАСТИЕМ РАСТВОРОВ КОМПЛЕКСНЫХ СОЛЕЙ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ СМЕСЕЙ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

Большинство методик разделения ионов металлов на ионитах основано на различии в устойчивости их комплексных соединений. Комплексообразующие реагенты или анионы можно использовать в качестве противоионов для смол, их можно вводить в растворы, из которых ведется сорбция, или использовать для десорбции удержанных катионов. С помощью этих реагентов можно переводить ионы металлов в незаряженные соединения или в анионные комплексы (последним приемом пользуются чаще). Меняя величину pH, комплексообразующий реагент и его концентрацию, можно в значительных пределах менять устойчивость комплексов и тем самым увеличивать различия в константах распределения, а в итоге повышать степень разделения.

РАЗДЕЛЕНИЕ ПЕРЕХОДНЫХ МЕТАЛЛОВ

Наиболее распространена и лучше всего отработана методика разделения переходных металлов в форме хлоридных комплексов. Фундаментальной в этой области является работа Крауса и сотр. [106], в которой описано систематическое разделение ряда металлов. Впоследствии этот метод был дополнен и расширен другими авторами. Устойчивость хлорокомплексов металлов в очень большой степени зависит от концентрации соляной кислоты в растворе. При элюировании раствором этой кислоты уменьшающейся концентрации из колонки с сильноосновным анионитом в Cl^--форме постепенно выходят разделенные ионы металлов.

Сильноосновному аниониту, например дауэксу 1-X8 (0,1—0,2 мм), дают набухнуть, затем помещают его в 9*M* соляную кислоту, далее промывают водой и вновь перемешивают с 9*M* соляной кислотой. С этим же раствором анионит переносят в колонку (1×25 см) и в ней промывают его 50 мл той же кислоты. Пробу, содержащую 5—20 мг никеля, меди, кобальта, железа и цинка, вводят в колонку в виде раствора в небольшом количестве соляной кислоты. Элюирование ведут той же кислотой при скорости потока 2 мл/мин, отбирая фракции объемом 125 мл. Никель элюируется в первой фракции. В процессе элюирования соляной кислотой постепенно уменьшающейся концентрации ионы элюируются в следующем порядке: 4*M* HCl — Co, 2,5*M* HCl — Cu, 0,5*M* HCl — Fe(III) и 0,005*M* HCl — Zn. Обнаруживают эти ионы методом хелатометрии. Ход разделения показан на рис. 5.12.

Отчетливые различия в устойчивости хлоридных комплексов позволяют также разделять соединения одного и того же металла с различной степенью окисления, например соединения двух- и трехзарядного железа [151]. В колонку (1,65 см$^2\times$ $\times$10 см) с сильноосновным анионитом амберлит IRA-400 (размер частиц около 0,15 мм), предварительно промытым 4*М* соляной кислотой, вводят смесь, содержащую по 5—20 мкг соединений железа в каждой из степеней окисления (в форме хлоридов) в небольшом объеме 4*М* соляной кислоты. При элюировании 25 мл 4*М* соляной кислоты со скоростью 0,25 мл$\cdot$ $\cdot$см$^{-2}\cdot$мин$^{-1}$ из колонки вымывается соединение железа(II), а при дальнейшем элюировании 30 мл 0,5*М* соляной кислоты — соединение железа(III). Эта методика пригодна для разделения смесей, соединений железа(II) и железа(III) в отношениях от 1 : 100 до 40 : 1. Точность разделения высокая, порядок элюирования показан на рис. 5.13.

Кроме хлоридных комплексов, для разделения металлов используются и другие галогенидные комплексы. Успешно проведено разделение 5-компонентной смеси катионов на сильнокислотном катионите с применением градиентного элюирования бромистоводородной кислотой увеличивающейся концентрации. Дауэкс 50-X8 (0,07—0,15 мм) сначала освобождают от мелких частиц, промывая в большой колонке водой, которая подается снизу вверх, затем промывают последовательно 10%-ным раствором цитрата аммония (pH 3), 3*М* соляной кислотой и в заключение водой до отрицательной реакции элюата на хлорид-ион. Обработанным таким образом катионитом заполняют ко-

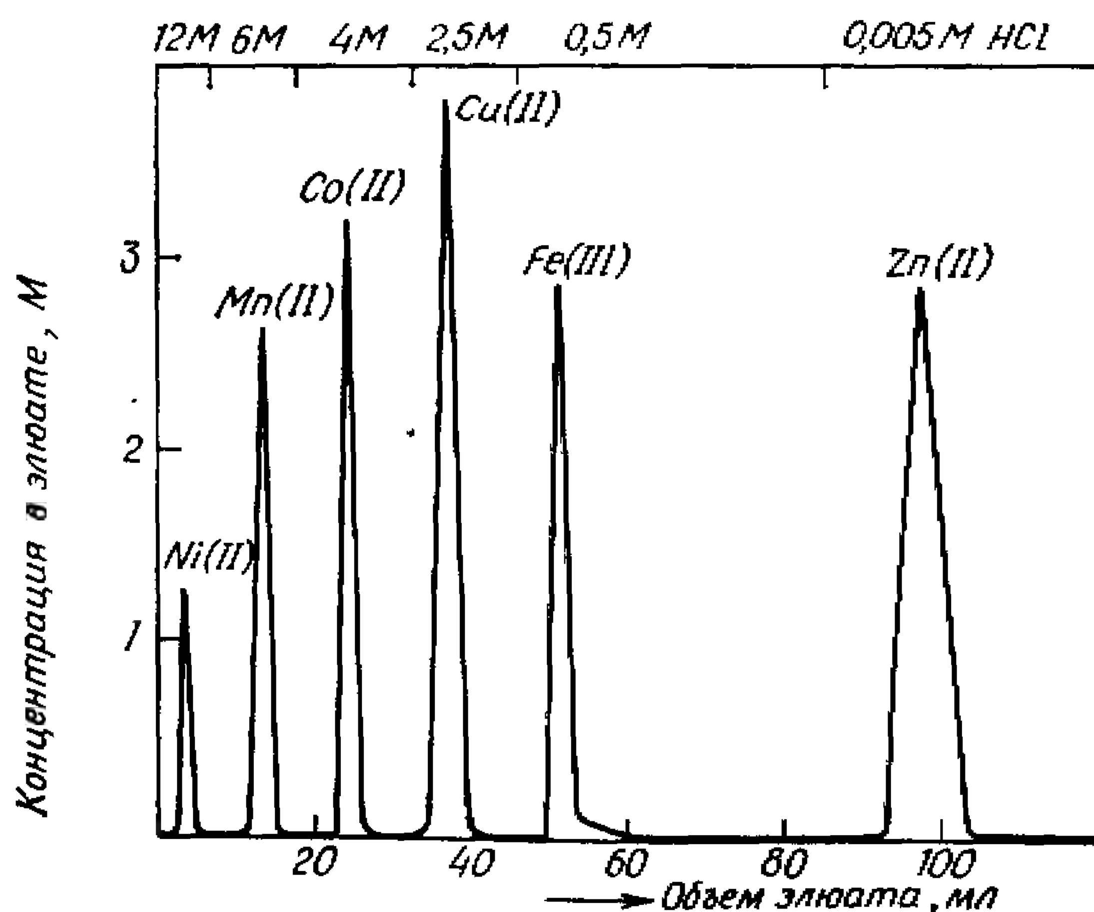


Рис. 5.12. Разделение хлоро-комплексов ионов переходных металлов на сильноосновном анионите дауэкс 1-X8 (100—200 мкм) элюированием соляной кислотой (колонки 1$\times$25 см) [106].

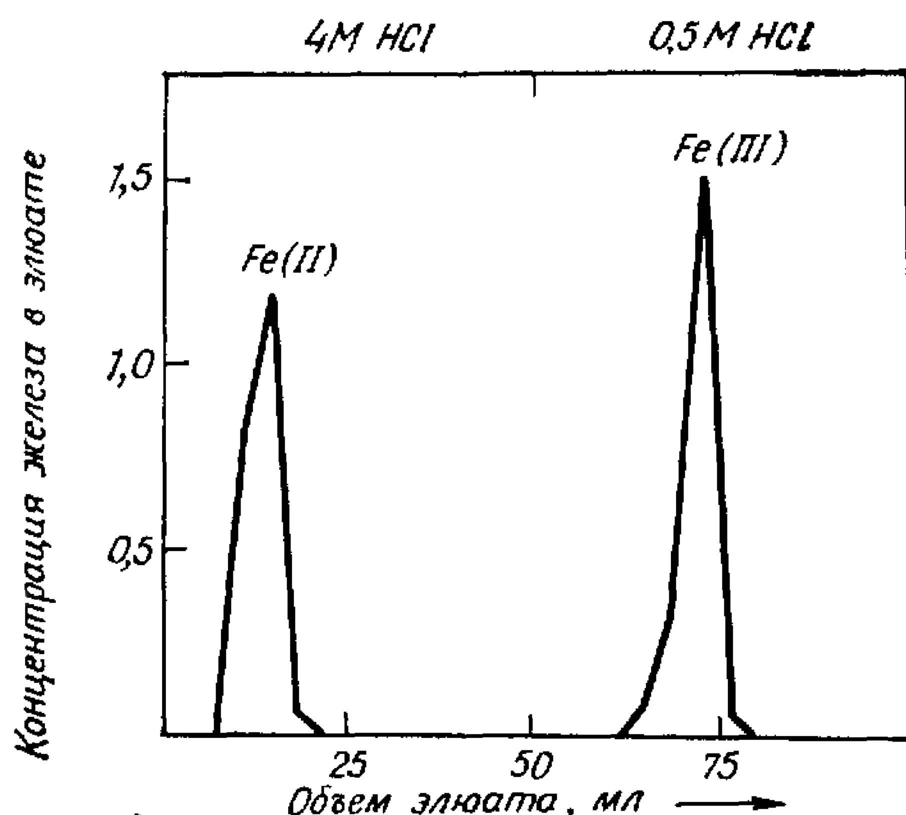


Рис. 5.13. Разделение двух- и трехвалентного железа на колонке 1,65 см²× ×10 см) с сильноосновным анионитом амберлит IRA-400 (150 мкм) элюированием соляной кислотой [151].

лонку (1,2×16 см) и медленно пропускают через нее 25 мл воды, содержащей по $0{,}25\cdot10^{-3}$ г-ион/л ионов Hg^{2+}, Bi^{3+}, Cd^{2+}, Pb^{2+} и Cu^{2+}. После этого колонку промывают 20 мл воды и начинают элюирование растворами бромистоводородной кислоты различной концентрации; элюирование ведется со скоростью 2 мл/мин. Ионы металлов вымываются из колонки в такой последовательности: 70 мл 0,1М HBr — Hg^{2+}, 100 мл 0,2М HBr — Bi^{3+}, 100 мл 0,3М HBr — Cd^{2+}, 200 мл 0,6М HBr — Pb^{2+} и, наконец, 100 мл 2М HBr — Cu^{2+}. В отбираемых фракциях металлы определяют методом хелатометрии.

РАЗДЕЛЕНИЕ МЫШЬЯКА, СУРЬМЫ И ОЛОВА

Очень интересно использование тиокомплексов металлов II аналитической группы для разделения этих металлов на анионитах [98]. Соответствующую методику можно с успехом применять для анализа сплава, полученного сплавлением пробы со смесью карбоната калия и серы. В результате такого сплавления мышьяк, сурьма и олово образуют соли соответствующих тиокислот.

Смесь, содержащую по 30—80 мг мышьяка, сурьмы и олова в форме солей тиокислот, сначала разбавляют до объема 100—150 мл 3%-ным раствором полисульфида натрия. Разделение ведут на колонке (1,7×13 см), заполненной дауэксом 2 в OH^--форме (0,3—0,8 мм), который удерживает ионы из анализируемого раствора. Сначала из колонки элюируют тиостаннат (700 мл 0,5М KOH, 2 мл/мин), затем тиоарсенат (3,5 л 1,2М KOH) и, наконец, тиоантимонат (1,5 л 3,5М KOH). Ото-

бранные фракции элюата подкисляют соляной кислотой, выпавшие в осадок сульфиды вновь растворяют, после чего олово определяют гравиметрически, а мышьяк и сурьму — титрованием.

РАЗДЕЛЕНИЕ МНОГОЗАРЯДНЫХ ИОНОВ

Примером быстрого и количественного разделения, которое было бы очень трудно осуществить без ионитов, может служить отделение циркония от других катионов и анионов, содержащихся в избытке [101]. В отличие от ряда других металлов цирконий в 0,05M серной кислоте образует отрицательно заряженный сульфатный комплекс, который прочно связывается сильноосновным анионитом в SO_4^{2-}-форме. В результате цирконий удается отделить от Ni, Co, Fe, Mn, Cr, Ti, Cd и других металлов. Для этого амберлит IRA-400 (0,1—0,3 мм) загружают в колонку (0,7×15 см) и тщательно промывают 2M серной кислотой, чтобы удалить из него хлорид-ионы. После промывки водой колонку приводят в состояние равновесия с 0,05M серной кислотой. Далее через колонку со скоростью 0,5 мл/мин пропускают 100 мл 0,05M серной кислоты, в которой растворены 1 мг Zr(IV) и 100 мг ионов других металлов. После этого, чтобы удалить из колонки последние следы мешающих элементов, ее промывают 100 мл той же кислоты. Цирконий элюируют из колонки 100 мл 4M соляной кислоты и определяют методом хелатометрии. При наличии в смеси молибдена и вольфрама разделение получается неполным; присутствие олова, ванадия и урана также усложняет анализ.

Как препаративные, так и аналитические методы разделения редкоземельных элементов в виде комплексных соединений дают весьма хорошие результаты. Успешным, например, оказалось градиентное элюирование α-оксимасляной кислотой из колонки с катионитом; при таком методе разделения четкие хроматографические пики удается получить даже при комнатной температуре [53].

Для отделения железа от магния можно воспользоваться реакцией с пирофосфатом. Железо(III) образует устойчивые комплексные анионы $[Fe_2(P_2O_7)_3]^{6-}$, которые проходят через колонку с катионитом в NH_4^+-форме при pH 2—3, в то время как магний прочно удерживается функциональными группами сильнокислотного катионита [159]. Титан, ниобий и тантал разделяют также в виде фторидных комплексов. Все эти три компонента можно элюировать из колонки с сильноосновным анионитом смесью плавиковой и соляной кислот [224].

В ряде устойчивых комплексов с этилендиаминтетрауксусной кислотой можно быстро разделить катионы на катионите дауэкс 50. Анализируемую пробу подают в колонку в виде рас-

твора в буферном растворителе. При определенных pH комплексы ионов некоторых металлов, например La, Sm, Y, Mg, в значительной степени диссоциированы, и эти металлы удерживаются на катионите, в то время как комплексы Th, Fe, Sc и Al проходят через колонку [55]. Различие в константах распределения используется при отделении на катионитах Co от Ni, а также Cr от Fe и Al; анализируемую пробу растворяют в разбавленной азотной кислоте, содержащей добавку ЭДТА или ДХТА [105].

Новые возможности для разделения дает сорбция на ионитах из смесей воды и органических растворителей, позволяющих изменять константы распределения. При использовании смешанного неводного растворителя меняется набухаемость ионита, а также сольватация ионов и обмениваемых групп и устойчивость комплексных соединений. Так, например, удалось отделить на сильнокислотном катионите следы лития от избытка кальция в пробе силиката; элюирование пробы проводили 0,5М раствором соляной кислоты в 80%-ном метаноле. Коркиш и Стрелов разработали большое число вариантов этой методики; соответствующие работы можно найти в журналах Chemical Abstracts.

5.9. ПРИМЕРЫ РАЗДЕЛЕНИЙ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Я. ШТАМБЕРГ

Структура органических соединений весьма разнообразна, и для хроматографического разделения этих соединений можно использовать самые различные реакции. На ионитах или аналогичных полимерных сорбентах можно разделять не только органические ионы, но и неионизованные и даже нерастворимые в воде соединения. Кроме ионного обмена для разделения используют также физическую адсорбцию, различие в растворимости в сорбенте и внешней фазе, молекулярноситовые эффекты, а также образование связей различных типов. Этим вопросам посвящено очень много работ, и мы ограничимся лишь некоторыми типичными примерами разделения на обычных ионитах, модифицированных ионитах и специальных полимерных сорбентах.

5.9.1. ХРОМАТОГРАФИЯ НА СИЛЬНОДИССОЦИИРОВАННЫХ ИОНИТАХ

На ионитах этого типа обычно разделяют водные смеси электролитов, и в таких случаях хроматографическое разделение обусловлено ионным обменом. *Азотистые основания* (основания

четвертичного аммония, амины и некоторые аминокислоты основного характера) разделяют [30] на сильнокислотных катионитах, элюируя их растворами соляной кислоты возрастающей концентрации; так же разделяют ионы щелочных металлов (рис. 5.14). С ростом молекулярной массы разделяемых катио-

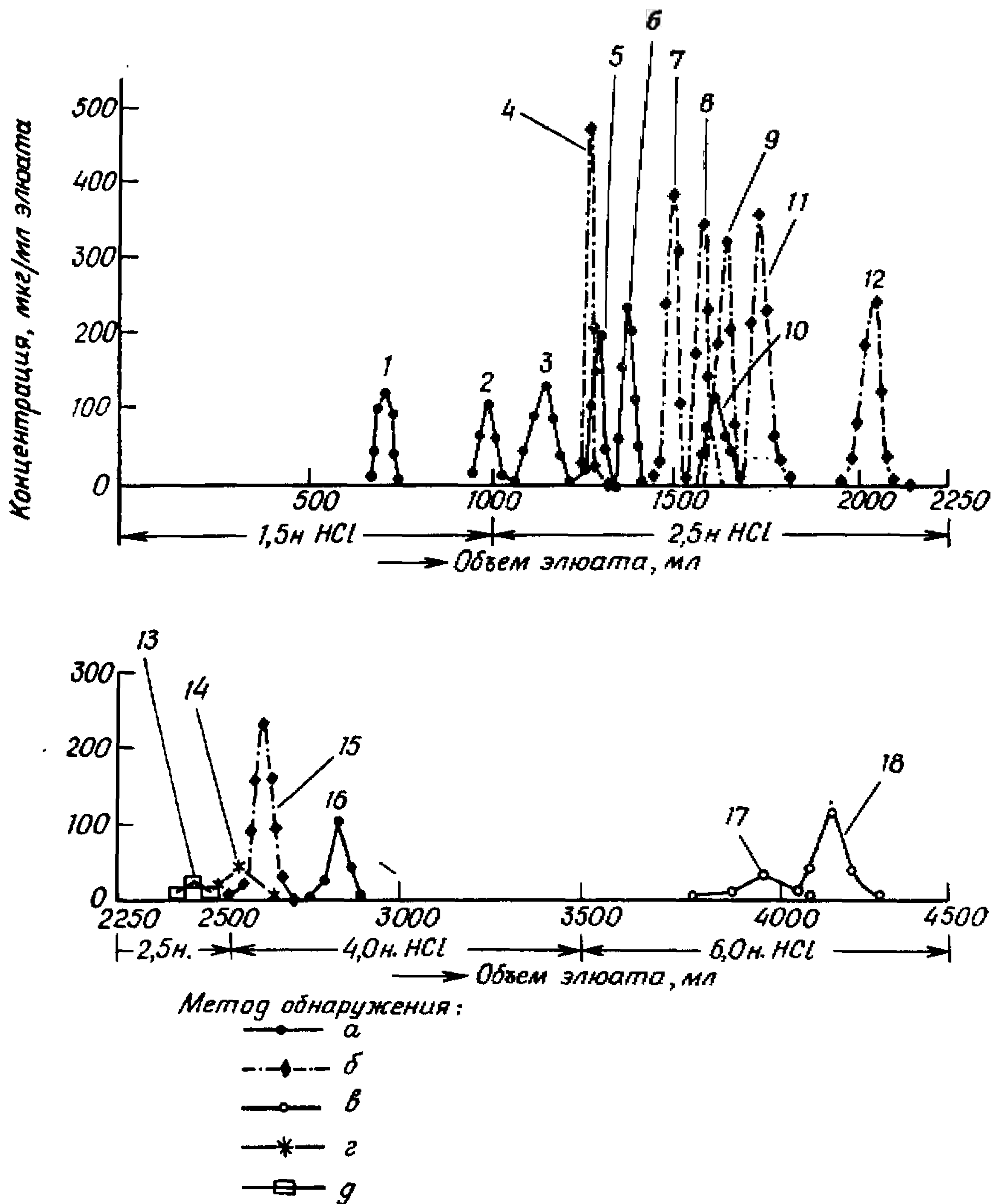


Рис. 5.14. Хроматографическое разделение четвертичных оснований аммония и других основных соединений азота на сильнокислотном катионите [30].

Колонка 3,2×60 см; ионит — дауэкс 50W-X8 (200—400 меш); элюент — 1 н. HCl, 90 мл/ч; проба — раствор анализируемых соединений по 15 мг каждого в 1 н. HCl; элюат отбирали порциями по 10 или 20 мл и определяли состав: *а* — нингидриновым методом, *б* — обрабатывая периодатом и измеряя поглощение при 365 нм, *в* — измеряя поглощение при 260 нм, *г* — обрабатывая смесью цианбромид — сульфаниловая кислота, *д* — обрабатывая смесью щелочь — ацетон и измеряя флуоресценцию.

Состав анализируемой пробы: *1* — серин, *2* — глицин, *3* — этаноламин, *4* — карнитин, *5* — γ-аминомасляная кислота, *6* — метиламин, *7* — бетаин, *8* — холин, *9* — γ-бутиробетаин, *10* — пролин, *11* — тетраметиламмонийхлорид и триметиламиноксид, *12* — стахидрин, *13* — N-метилникотинамид, *14* — никотиновая кислота, *15* — тригонеллин, *16* — гистидин, *17* — дисульфиды эрготионина и тиолгистидина, *18* — тиамин.

нов наряду с ионным обменом начинают проявляться молекулярноситовой эффект и физическая адсорбция. Роль физической адсорбции растет с уменьшением степени диссоциации аминов и сильнее сказывается в растворителях, подавляющих электролитическую диссоциацию. Слабоосновные соединения азота типа пиридина и его производных или некоторых аминов успешно разделяют на ионитах методом высаливающей хроматографии в условиях, аналогичных используемым для разделений неионизованных нерастворимых в воде органических соединений [165]. Амиды очень слабоосновных аминокислот адсорбируются на катионитах из раствора в ацетонитриле, после чего их можно элюировать метанолом [27].

Значительное внимание в литературе уделяется ионообменной хроматографии *органических кислот*. Разделение аминокислот описано в разд. 5.10, а здесь мы обсудим лишь хроматографическое разделение замещенных и незамещенных карбоновых кислот. Хурачек и Яндера [31, 85а] опубликовали обзор работ, появившихся в печати в последние годы. В основном в литературе обсуждается хроматографическое разделение карбоновых кислот на обычных катионитах и анионитах в водных и неводных средах с использованием ионного обмена и ряда других взаимодействий.

Так, например, ароматические оксикислоты разделяют на сильноосновном анионите (рис. 5.15). Незамещенные карбоновые кислоты сорбируются на сильнокислотных катионитах в H^+-форме, и в этих условиях их можно разделять хроматографически (рис. 5.16). Сульфокислоты относятся к числу сильно диссоциирующих соединений, и их можно разделять методом ионообменной хроматографии даже на слабоосновных анионитах. Муттер [132] описал разделение алкилсульфонатов с различным числом атомов углерода и различным числом сульфогрупп в молекуле на среднеосновном полидекстрановом анионите с диэтиламиноэтильными группами [DEAE-сефадекс А 25 (0,04—0,12 мм)]. Моносульфонаты элюируют 0,3 н. раствором бикарбоната аммония в водном пропаноле (3 : 2), а полисульфонаты — 1 н. водным раствором бикарбоната аммония. Ароматические сульфокислоты образуют очень прочные связи с анионитами, поскольку при их взаимодействии активную роль играет физическая адсорбция между ароматическими остатками сорбата и сорбента. По этой причине предпочтение отдают таким методикам, в которых ограничено участие в сорбции связывающих взаимодействий. Хроматографические разделения соединений этого типа успешно осуществляют на карбоновых катионитах [143] и методом высаливающей хроматографии [56].

Фенолы и замещенные фенолы — очень слабые кислоты, но тем не менее их можно разделять методом ионообменной хро-

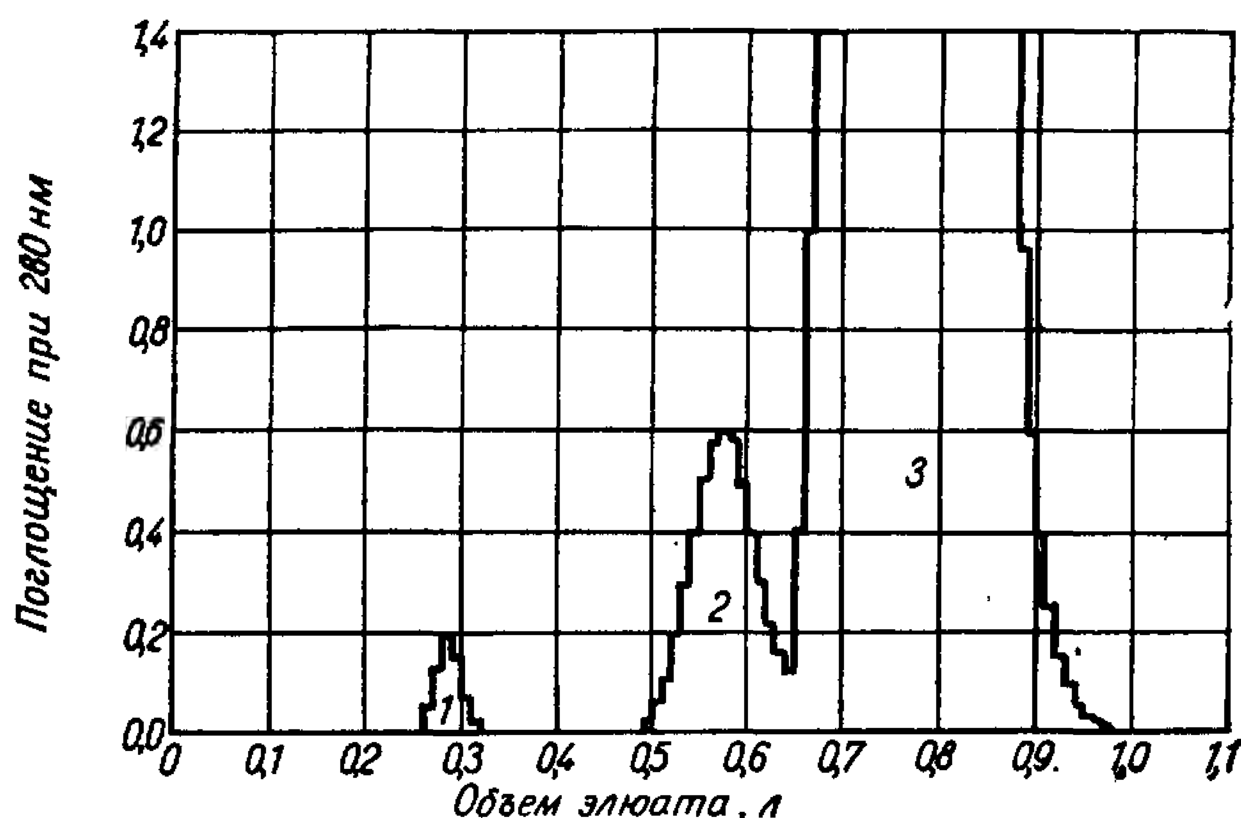


Рис. 5.15. Хроматографическое определение следов бензойной и *п*-оксибензойной кислот в *м*-оксибензойной кислоте на сильноосновном анионите [182].

Колонка 13×330 мм; ионит — дауэкс 2-Х8 (200—400 меш) в ацетатной форме; градиентное элюирование, начиная с 15%-ной уксусной кислоты, смешанной с 200 мл метанола, со скоростью 2—3 мл/мин; обнаружение — УФ-спектрофотометрирование фракций по 10 мл; проба — 50—100 мг технической *м*-бензойной кислоты в концентрированном метанольном растворе, содержащем небольшие количества бензойной и оксибензойных кислот. По окончании элюирования всю салициловую кислоту, которая может содержаться в ионите, вытесняют ледяной уксусной кислотой.

Состав анализируемой смеси: *1* — 1,0% бензойной кислоты, *2* — 1,0% *п*-оксибензойной кислоты, *3* — 98% *м*-оксибензойной кислоты.

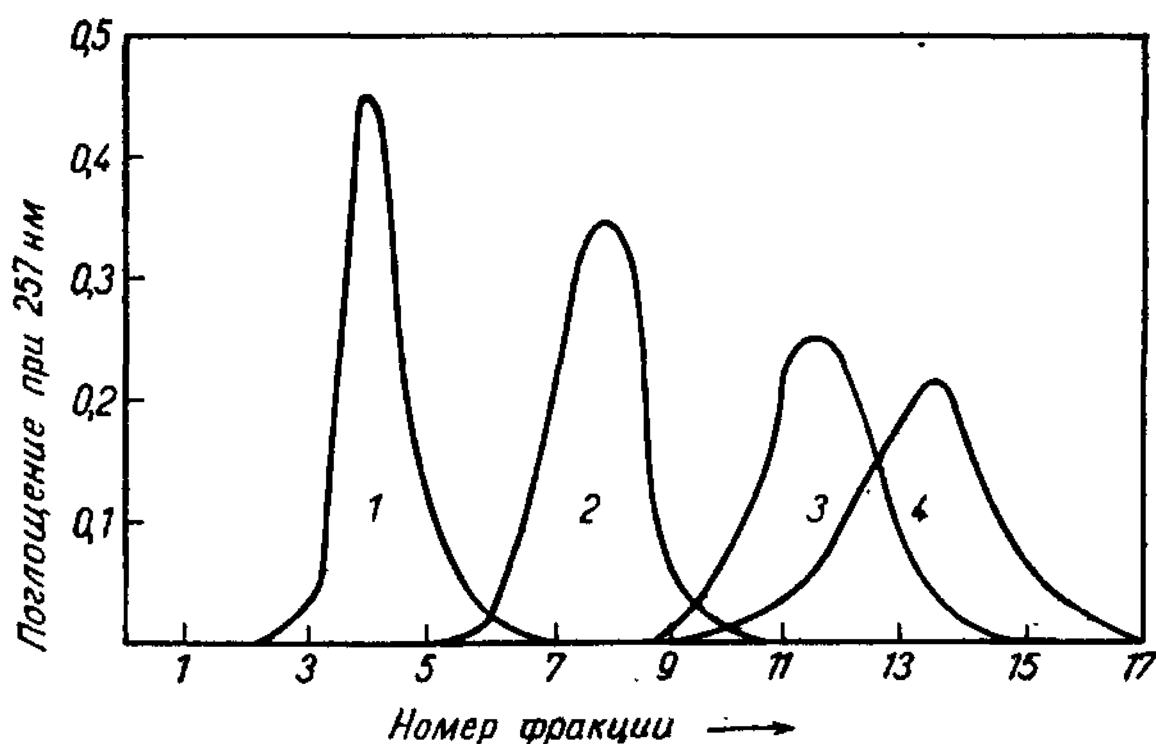


Рис. 5.16. Разделение смеси кислот на сильнокислотном катионите [142].

Ионит — дауэкс 50W-X4 (100—200 меш), Н+-форма, 131 мл, 53 см; элюент — вода; элюат отбирали порциями по 25 мл и определяли фенилуксусную кислоту по УФ-поглощению при 257 нм, другие кислоты — титрованием щелочью; проба — 26 мл водного раствора уксусной (*1*), валериановой (*2*), капроновой (*3*) и фенилуксусной (*4*) кислот по 0,63 мэкв. каждой.

матографии. Скелли [181] разделял хлорфенолы на сильноосновном анионите, используя градиентное элюирование водной системой уксусная кислота — метанол. Ему удалось количественно отделить 4-хлорфенол, 2,6-дихлорфенол и 2,4,6-трихлорфенол от большого избытка 2,4-дихлорфенола. Незамещенные фенолы хроматографируют на сильнокислотном катионите,

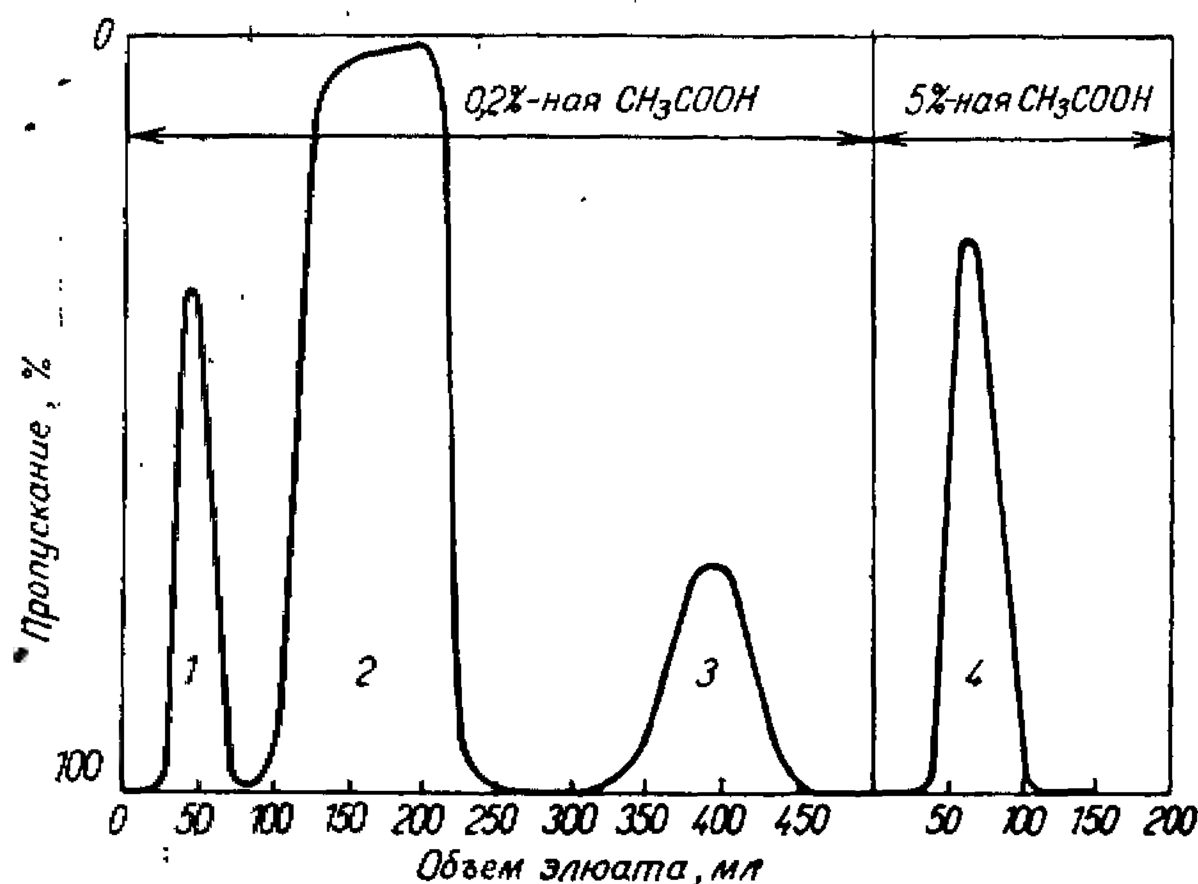


Рис. 5.17. Разделение хлорфенолов на сильноосновном анионите типа II [181].

Колонка 1,3×20 см; ионит — дауэкс 2-X8 (200—400 меш) в ацетатной форме, промытый метанолом; градиентное элюирование 0,2%-ной уксусной кислотой, смешанной с 200 мл метанола, со скоростью 2—3 мл/мин, этот элюент вымывает все компоненты, кроме 2,4,6-трихлорфенола, который элюируют 5%-ной уксусной кислотой; проба — 6 мл метанольного раствора смеси 70 мг 2,4-дихлорфенола и по 2 мг 4-хлор-, 2,6-дихлор- и 2,4,6-трихлорфенолов; обнаружение — методом фотометрии (280 нм).

Состав анализируемой пробы: *1* — 4-хлорфенол, *2* — 2,4-дихлорфенол, *3* — 2,6-дихлорфенол, *4* — 2,4,6-трихлорфенол.

элюируя водой [191] или цитратным буферным раствором [104]. Поскольку незамещенные фенолы очень слабо диссоциируют, для их разделения можно с успехом применять солюбилизационную хроматографию, предназначенную для разделения неионизующихся плохо растворимых в воде органических соединений [177].

Иониты можно применять для хроматографирования и неионогенных *спиртов.* Большинство низших спиртов легко разделяется с помощью газовой хроматографии, приемлема также и высаливающая хроматография (см. разд. 1.2.6) на сильноосновном анионите [167]. Высшие спирты можно с успехом разделять методом солюбилизационной хроматографии на сильнокислотном катионите (рис. 5.18). Многоатомные спирты хроматографируют методом вытеснительной хроматографии на сильнокислотном катионите [34] и на сильноосновном анионите с использованием воды [227а].

Кроме спиртов, на ионитах обычного типа разделяют ряд других *органических соединений неионного характера,* более или менее растворимых в воде. На сильнокислотных катионитах методом высаливающей хроматографии с использованием сульфата аммония в качестве элюента удалось разделить алифатические эфиры (C_2—C_8) [166], альдегиды [22] и нитросоедине-

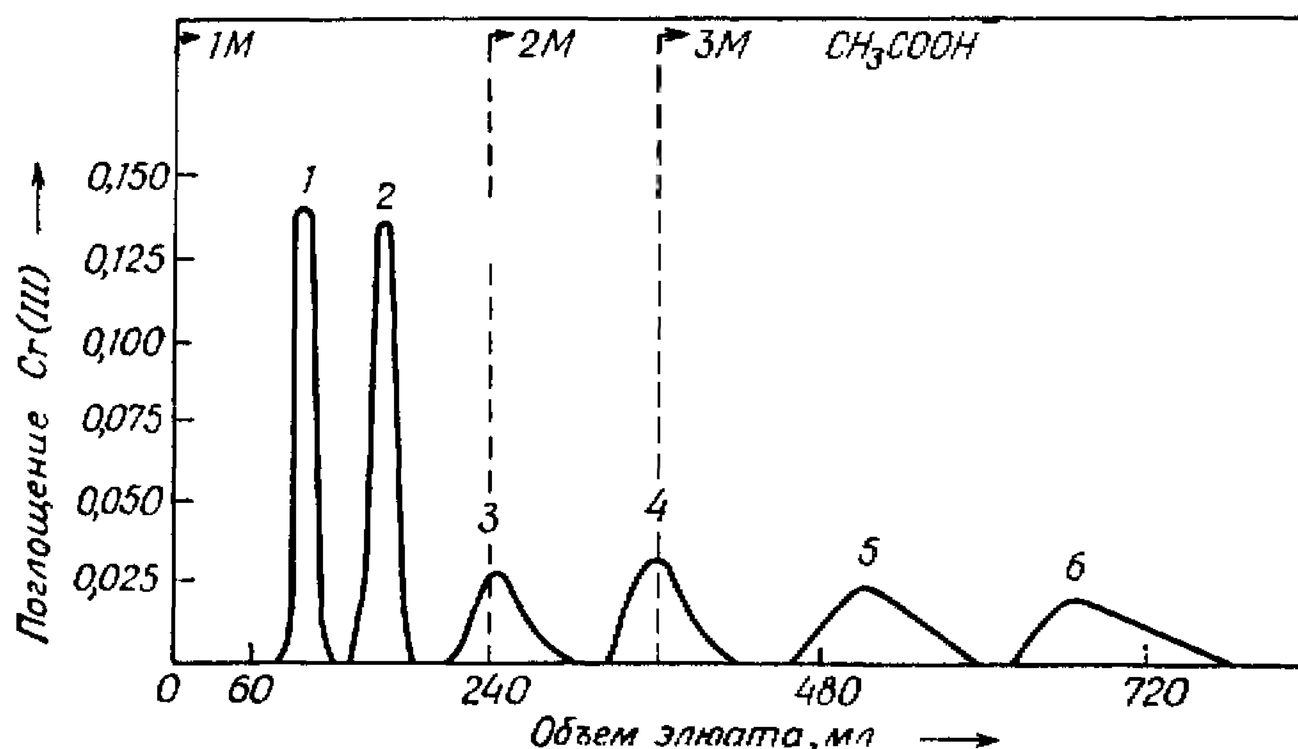


Рис. 5.18. Солюбилизационная хроматография спиртов C_5—C_9 на сильнокислотном катионите [177].

Колонка 2,28 см²×39 см; ионит — дауэкс 50-Х8 (200—400 меш) в H^+-форме; градиентное элюирование со скоростью 0,48 см/мин 1М, 2М и 3М уксусной кислотой; элюат отбирали порциями по 6 мл и после добавления смеси хромовой и серной кислот определяли содержание Cr^{3+} фотометрированием; проба — 1 мл раствора смеси спиртов (0,2 ммоль) в 50%-ной уксусной кислоте.

Спирты, входящие в состав анализируемой пробы: *1* — *трет*-амиловый, *2* — *н*-амиловый, *3* — *н*-гексиловый, *4* — *н*-гептиловый, *5* — *н*-октиловый, *6* — *н*-нониловый.

ния [94]. По тому же принципу, используя растворы хлорида лития, соляную кислоту или воду, можно разделять сложные смеси алкилфосфатов [85]. Методом солюбилизационной хроматографии на сильнокислотном катионите с метанолом в качестве элюента можно разделять метилалкилкетоны [178].

5.9.2. ХРОМАТОГРАФИЯ НА ИОНИТАХ МОДИФИЦИРОВАННОЙ СТРУКТУРЫ

Чтобы повысить эффективность хроматографического разделения, вместо ионитов обычных типов применяют иониты с модифицированной структурой. С целью улучшения условий взаимодействия сорбат — сорбент в неводных системах используют *крупнопористые иониты,* сорбция на которых идет преимущественно на внутренней поверхности пор (см. разд. 5.2.6) независимо от способности к набуханию основной массы полимера. Крупнопористые катиониты применяют, например, для разделения амидов элюированием смесью ацетонитрил — метанол [27].

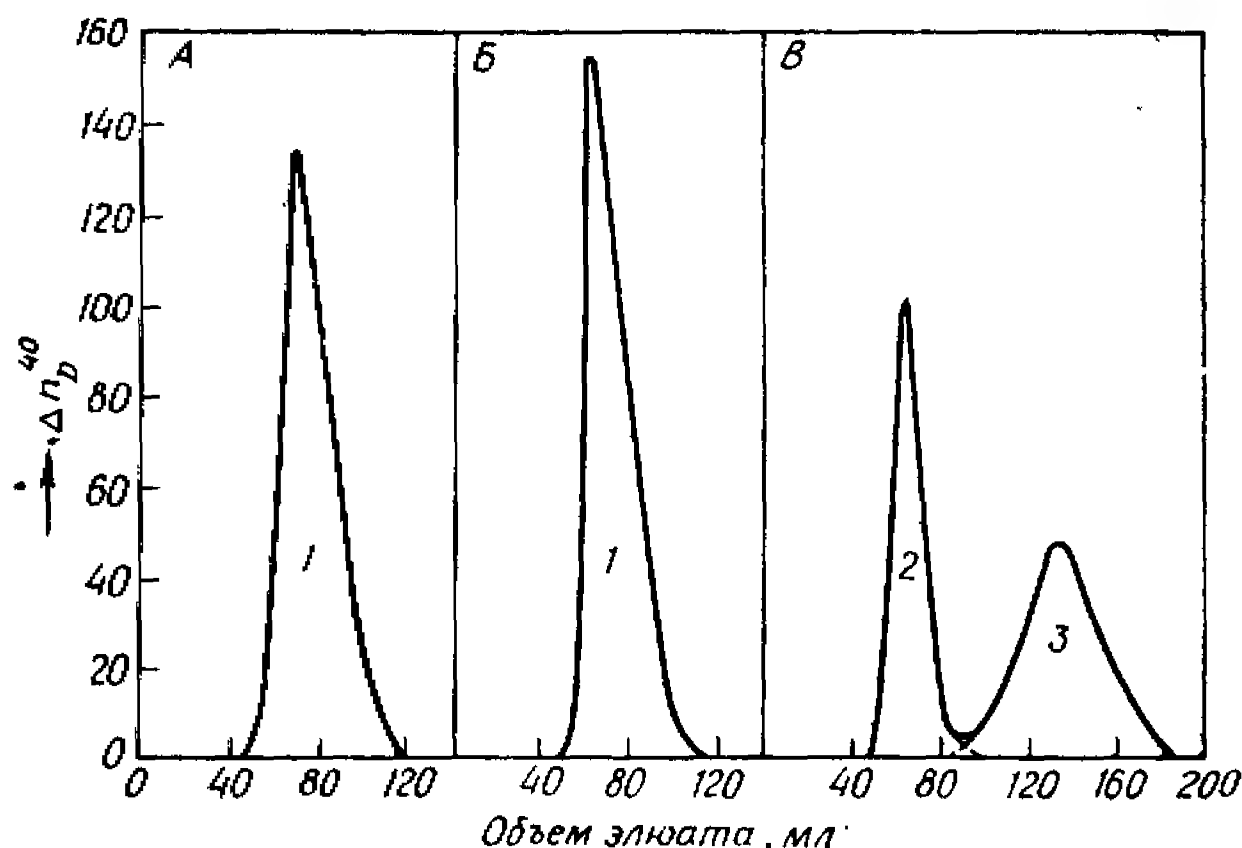


Рис. 5.19. Влияние природы противоиона на разделительную способность ионита на примере хроматографирования смеси пропиленгликоля и *трет*-бутилового спирта [183].

Хроматограммы, полученные на сильнокислотном катионите дауэкс 50-Х8 в H^+-форме (*А*), сильноосновном анионите дауэкс 1-Х4 в Cl^--форме (*Б*) и на дауэксе 1-Х1 в форме ди-(2-этилгексил)фосфата (на 90%) (*В*).

Условия разделения на последнем ионите: колонка 1,27 внутр. диам., 85 $см^3$; элюент — вода, 1 мл/мин; обнаружение — по показателю преломления; температура 70 °С; проба — 10 мл раствора смеси пропиленгликоля (20%) и *трет*-бутилового спирта (20%).

Состав анализируемой пробы: *1* — смесь компонентов, *2* — пропиленгликоль, *3* — *трет*-бутиловый спирт.

С целью улучшения органофильных свойств ионитов модифицируют их химическую структуру или меняют природу противоионов. *Сильноосновные аниониты с большими органическими анионами* (с бифильными противоионами) успешно применяют для разделения спиртов (рис. 5.19). К усилению органофильных свойств приводит и уменьшение содержания в ионите обмениваемых групп. *Катиониты малой емкости* успешно применяют для разделения алкилфосфатов методом высаливающей хроматографии [85]. Цук и Грегор [213] использовали *олеофильные иониты,* в структуру которых вводят ковалентно связанные органофильные остатки. Так, например, на олеофильном сильнокислотном катионите эти авторы отделили анилин от пиридина, элюируя пробу раствором *н*-бутиламина в гептане.

В литературе описано несколько примеров успешного хроматографирования органических соединений на *ионитах с обращенной сорбционной функцией.* Так, например, связывая боратные анионы на анионитах, получают сорбенты, образующие комплексные связи с многоатомными спиртами или сахарами. На рис. 5.20 показаны результаты разделения сложной смеси гликолей и глицерина [164]. На сильноосновных анионитах в бисульфитной форме разделяют альдегиды и кетоны, с которыми иониты реагируют с образованием нестойких α-оксикислот.

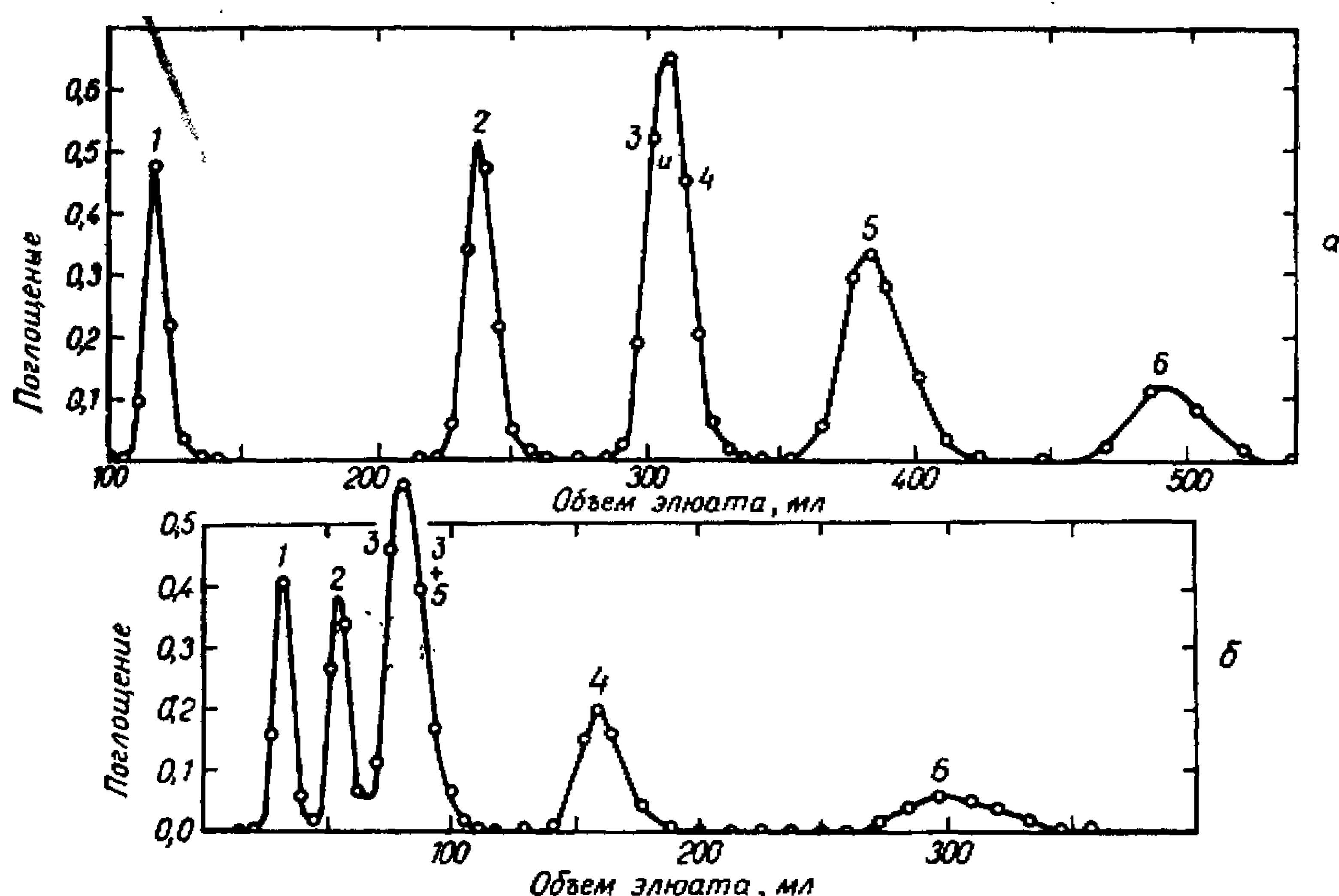


Рис. 5.20. Разделение многоатомных спиртов на сильноосновном анионите в боратной форме [164].

Колонка 2,28 см²×76,5 см (*а*) и 2,28 см²×20 см (*б*); ионит — дауэкс 1-Х8 (200—300 меш), промытый элюентом; элюент — 0,928 н. $NaBO_2$ (*а*) и 0,02М бура (*б*); элюат отбирали порциями по 2 мл и анализировали фотометрически с применением окислительного метода; проба — смесь 26—56 мг спиртов, приготовленная из ~2М растворов.

Состав анализируемой пробы: *1* — диэтиленгликоль, *2* — этиленгликоль, *3* — 1,2-пропиленгликоль, *4* — глицерин, *5* — бутиленгликоль (*мезо*-изомер), *6* — *dl*-бутиленгликоль.

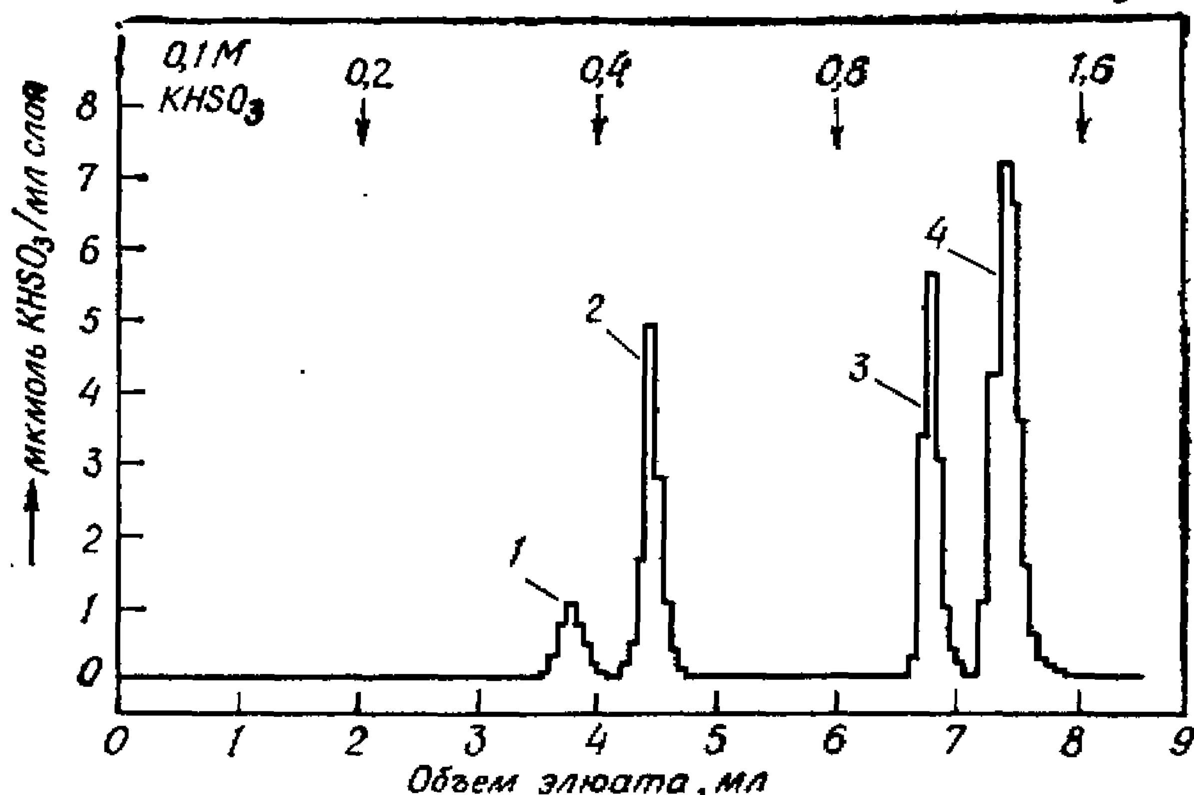


Рис. 5.21. Разделение карбонильных соединений на сильноосновном анионите в бисульфитной форме [83].

Колонка 0,96×60 см (45 мл); ионит — дауэкс 1-Х10 (100—200 меш) в бисульфитной форме; элюент — раствор бисульфита натрия увеличивающейся концентрации; скорость потока 0,2 мл/мин; проба — 82 мл смеси ацетола (0,01 нмоль), альдегида молочной кислоты (0,03 нмоль), пирувата натрия (0,04 нмоль), альдегида пировиноградной кислоты (0,044 нмоль); обнаружение иодометрическим методом. Выделены: *1* — ацетол, *2* — альдегид молочной кислоты, *3* — пировиноградная кислота, *4* — альдегид пировиноградной кислоты.

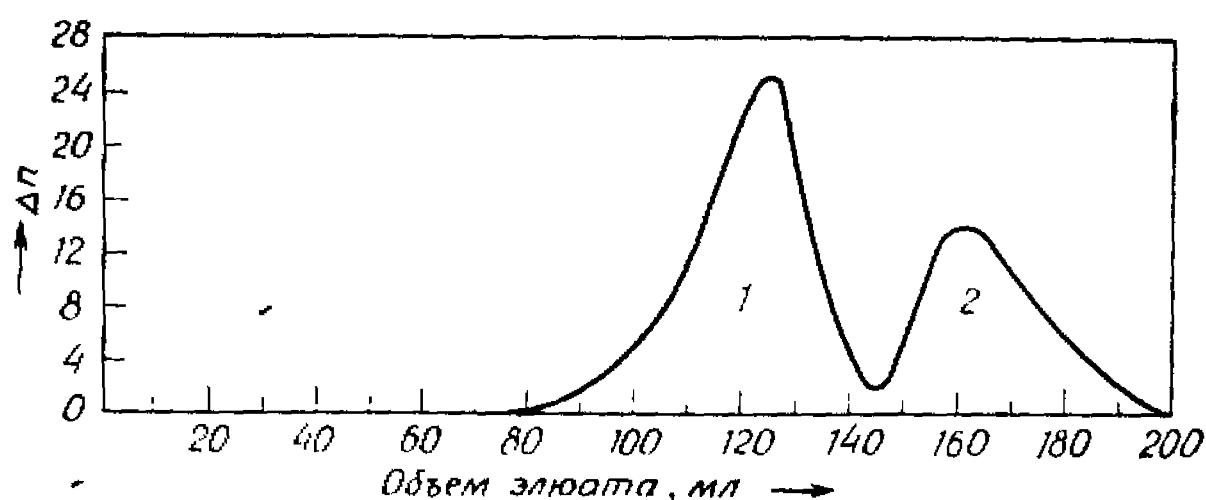


Рис. 5.22. Разделение метиловых эфиров элаидиновой (*1*) и олеиновой (*2*) кислот на макропористом катионите в Ag^{+}-форме [48].

Колонка 1,3×200 см; катионит — амберлист XN1005 с внутренней удельной поверхностью около 122 $м^2/г$; элюент — метанол; скорость потока — 0,5—1,0 мл/мин; обнаружение — непрерывное с помощью проточного разностного рефрактометра.

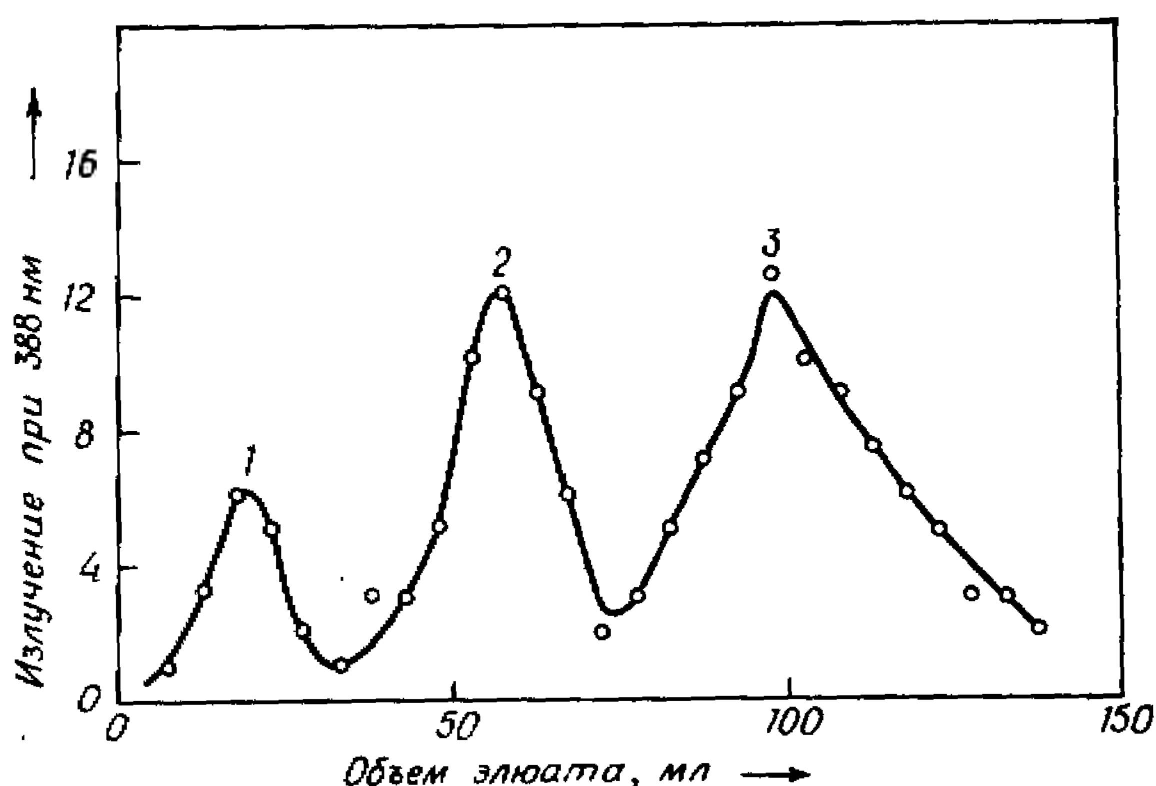


Рис. 5.23. Разделение три-, тетра- и гексаметилендиаминов методом лигандообменной хроматографии [109].

Колонка диаметром 0,7—1,0 см; ионит — 10 мл дауэкса 50W-X8 (50—100 меш) в Ni^{2+}-форме (общее содержание никеля в колонке 11 ммоль); элюент — 1,22М раствор аммиака; скорость потока 0,2—0,5 мл/мин; обнаружение — непрерывное детектирование пламенным фотометром.

Выделены: *1* — 1,6-гекса-, *2* — 1,4-тетра-, *3* — 1,3-триметилендиамин.

Результаты успешного разделения четырех карбонильных соединений с трехчленными углеродными цепями представлены на рис. 5.21 [83]. Ряд хроматографических разделений можно осуществить на катионитах с коионами тяжелых металлов. Катиониты в Ag^{+}-форме дают комплексы с ненасыщенными связями —C=C—. С помощью таких катионитов можно разделять эфиры *цис*- и *транс*-замещенных ненасыщенных жирных кислот (рис. 5.22, см. разд. 4.5.3). Аналогичный сорбент — крупнопористый катионит амберлист 15 в Ag^{+}- или в Cu^{2+}-форме (который, как выяснилось, непригоден для разделения ненасыщенных эфиров [45]) — использовали для разделения тиолов и диал-

килсульфидов [135]. Гельферих [70] предложил применять катиониты в Ni-, Cu- и Co-формах для лигандообменной хроматографии: поскольку не все координационные центры ионов металлов участвуют в связывании с обмениваемыми группами катионита, возможно образование комплексов с аминами. Этот принцип был использован при разделении полиэтилендиаминов (рис. 5.23).

5.9.3. ХРОМАТОГРАФИЯ НА ПОЛИМЕРНЫХ СОРБЕНТАХ

Рационально используя методики синтеза, можно приготавливать сорбенты «по мерке», т. е. специально для требуемого разделения. Большое внимание уделялось поиску *асимметричных сорбентов* с активными группами, пригодными для разделения оптических изомеров. В литературе описан ряд таких попыток, но в большинстве случаев авторам удалось добиться лишь частичного успеха [24]. Для сорбции соединений с тиольными группами приготавливали *меркурированные полимеры*, на которых были, в частности, разделены цистеин и глутатион [124]. Сорбенты на основе нитрованных ароматических полимеров применяли для разделения ароматических углеводородов (рис. 5.24). Успешные хроматографические разделения проведены на крупнопористых сополимерах стирола и дивинилбензола, не содержащих функциональных групп. С помощью этих сополимеров можно успешно отделить, например, нафталинмоносульфонат от дисульфоната (рис. 5.25). В работе [56а] описано разделе-

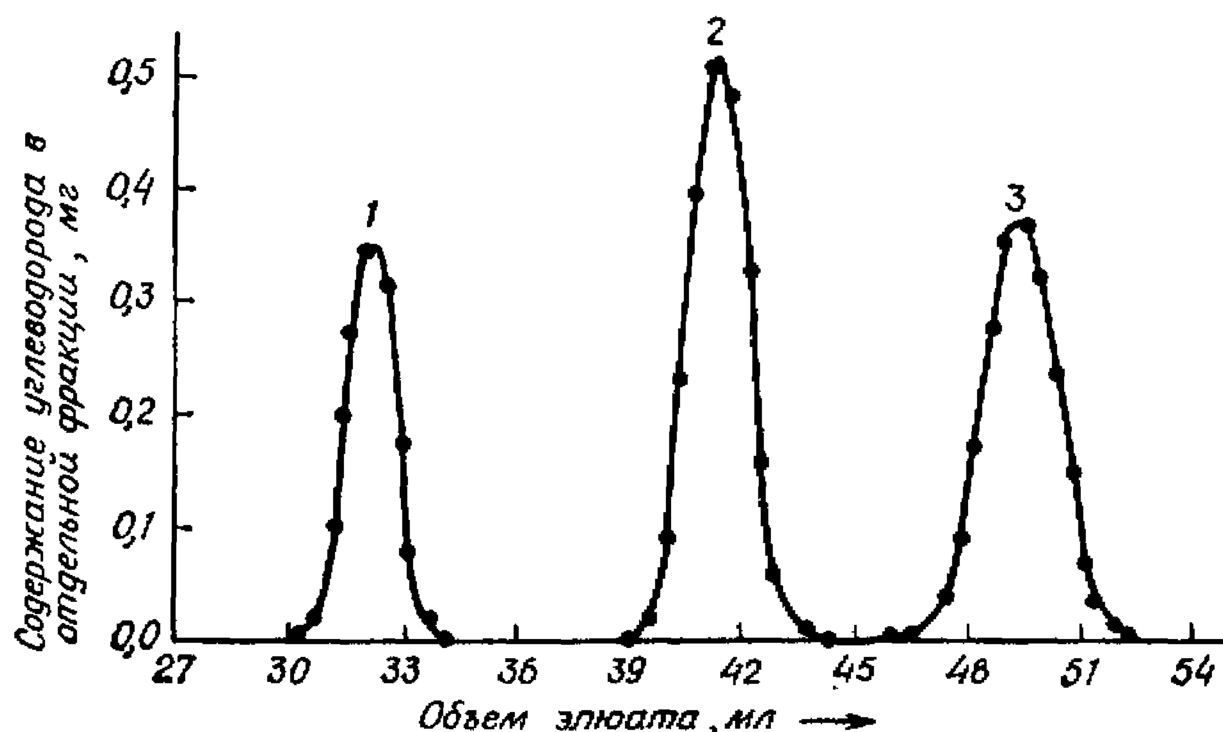


Рис. 5.24. Разделение ароматических углеводородов на нитрованном полистирольном сорбенте [8].

Колонка 1,23×48,5 см; сорбент — сополимер стирола и дивинилбензола, содержащий 2% дивинилбензола (сополимер алкилировали бензилхлоридом по методу Фриделя-Крафтса, а затем нитровали дымящей азотной кислотой в серной кислоте; полученный «тетранитробензилполистирольный» сорбент размалывали и методом осаждения выделяли фракцию с частицами размером 250—270 меш, взвесь этой фракции в ацетоне вводили в колонку); элюент — ацетон; скорость потока 5 мл/ч; проба — смесь углеводородов по 3—6 мг каждого в 0,3 мл ацетона; отбор фракций — автоматическим коллектором; обнаружение — методом УФ-спектрофотометрии или ГЖХ.

Выделены: *1* — тетрафенилэтилен, *2* — терфенил, *3* — фенантрен.

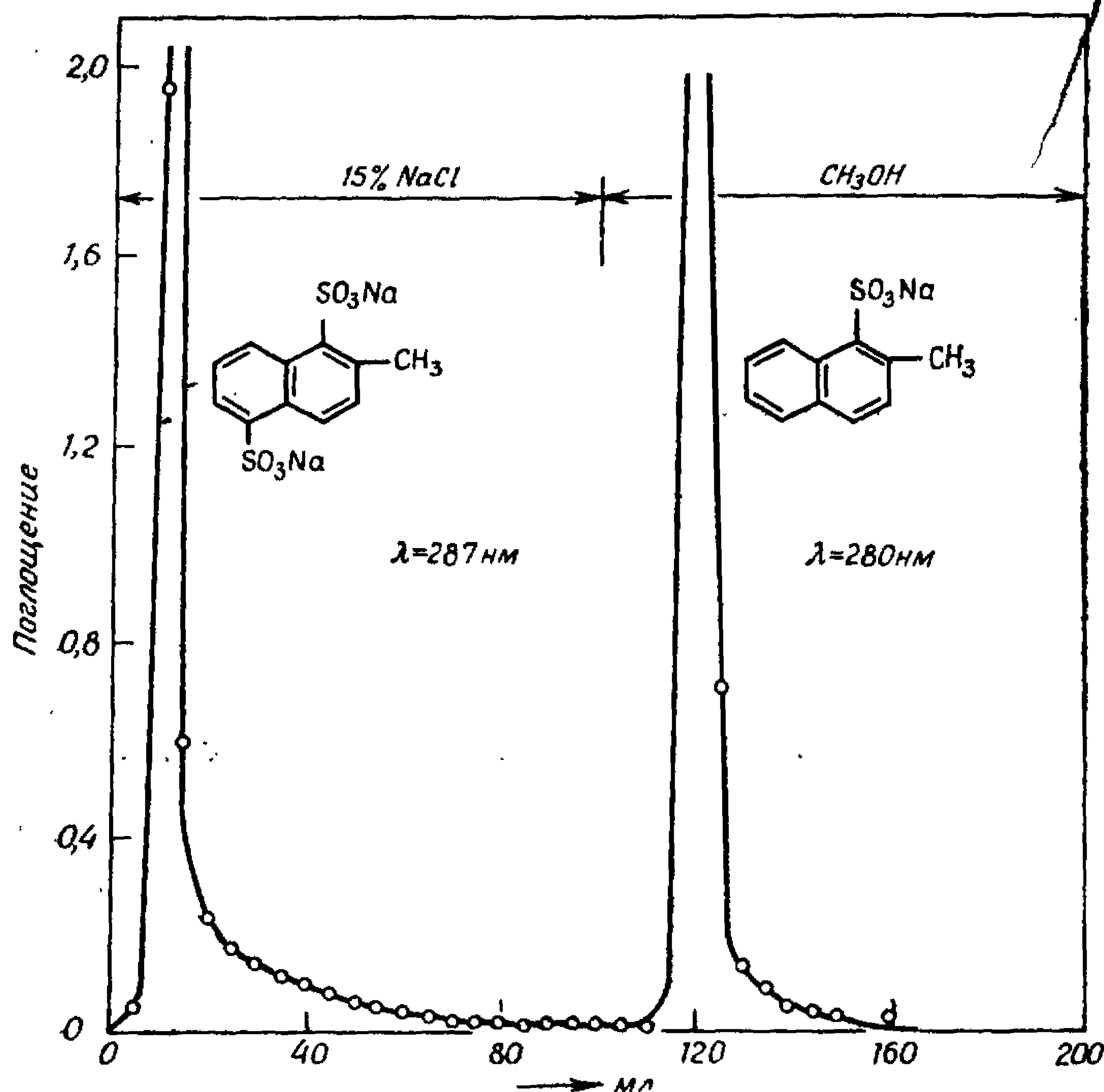


Рис. 5.25. Разделение нафталинсульфокислот на макропористом сополимере стирола и дивинилбензола без функциональных групп [173].

Колонка 1,2×15 см; ионит — амберлит XAD-2, промытый метанолом и водой; элюент — 15%-ный хлорид натрия и метанол; ступенчатое элюирование со скоростью 1,5—2 мл/мин; обнаружение — фракции по 10 мл анализируют титрованием или УФ-спектрометрически при 287 или 280 нм.

ние D- и L-форм аспарагиновой кислоты на слабокислотном катионите с присадкой из D-формы $Co(en)_3^{3+}$ [56а].

Приведенные в этом разделе примеры показывают, что ионообменная хроматография органических соединений успешно сочетается с другими хроматографическими методами. Помимо собственно ионного обмена, для разделения используются взаимодействия другого рода. Хроматография на ионитах постепенно становится одним из вариантов жидкостной хроматографии на полимерных сорбентах.

5.10. ПРИМЕНЕНИЕ ИОНИТОВ В БИОХИМИИ

О. МИКЕШ, К. ШЕБЕСТА

Иониты очень широко применяются в биохимии, и в рамках одной главы практически невозможно дать более или менее полный обзор всех работ. Мы рассмотрим лишь несколько при-

Таблица 5.13

Список монографий и обзорных работ, в которых рассматривается разделение белков, нуклеиновых кислот и их фрагментов методом ионного обмена

Область применения или тип анализируемых соединений	Литература
Общая биохимия	93, 100, 130, 152, 201, 223, 227
Разделение на ионообменных производных целлюлозы и полидекстрана	100, 149, 206, 207, 222
Аминокислоты	11, 18, 68, 73, 146, 168, 185, 201, 228, 234
Пептиды	46, 72, 74, 88, 99, 145, 169, 170, 228
Белки	9, 37, 145, 152, 158, 201, 228
Ферменты	121, 160
Пуриновые и пиримидиновые основания	79, 230
Нуклеозиды и нуклеотиды	69, 79, 230
Нуклеиновые кислоты	17, 20, 32, 93а, 103, 201, 205, 229

меров, демонстрирующих эффективность этого метода в решении некоторых биохимических проблем. Поскольку в предыдущих разделах рассматривались вопросы общего характера, мы считаем целесообразным в заключение детально обсудить несколько конкретных примеров. Более полную информацию можно найти в монографиях и обзорах, перечисленных в табл. 5.13. Монографии и обзорные статьи, посвященные более узким отделам биохимии, а оригинальные работы также приведены в библиографических списках монографий Дейла и сотр. [40, 41].

5.10.1. АМИНОКИСЛОТЫ

В настоящее время интенсивно развиваются методы автоматического анализа аминокислот. Основы этих методик заложены Спакманом и сотр. [186], которые использовали в своей работе метод ионообменной хроматографии на сильнокислотных катионитах, разработанный Муром и Штейном [126]. В настоящее время ведутся поиски способов ускорения анализов и совершенствуются анализаторы (см. гл. 8). Разрабатывается техника анализа белков и продуктов гидролиза пептидов, а также физиологических жидкостей. Анализ соединений первой группы проще, поскольку он предусматривает разделение лишь тех 18—20 аминокислот, которые обычно встречаются в продуктах гидролиза пептидов. Анализ физиологических жидкостей слож-

нее, поскольку помимо упомянутых аминокислот эти жидкости содержат амиды кислотных аминокислот (аспарагин и глутамин), аминокислоты, которые не встречаются в белках, а также пептиды и ряд других соединений. Разрабатываемые методики анализа этих соединений предполагают использование классических двухколоночных систем (сильно удерживаемые соединения основного характера анализируют на короткой колонке, а соединения нейтрального и кислотного характера — на длинной колонке), а также систем с одной колонкой. Сначала рассмотрим два примера процедур, предназначенных для ускорения анализов физиологических жидкостей на короткой и длинной колонках, а далее приведем пример разработки очень быстрой одноколоночной методики анализа аминокислот, содержащихся в продуктах гидролиза.

Бенсон и Паттерсон [15] описали методику быстрого хроматографического анализа аминокислот, входящих в состав физиологических жидкостей. Они использовали гранулированные иониты и иониты со сферическими зернами и вели анализ по слегка модифицированному варианту двухколоночной методики Спакмана и сотр. [186] с применением аминокислотного анализатора Beckman Spinco Model 120 C (см. гл. 8). Позднее Бенсон и сотр. [14] приспособили эту методику для анализа соединений нейтрального и кислотного характера в присутствии литиевых буферных растворов, которые обеспечивают хорошее разделение глутамина и аспарагина. Авторы работы [15] применили эту методику для разделения соединений основного характера, а авторы [14] — для разделения соединений с нейтральными и кислотными свойствами. В обоих случаях применялись иониты со сферическими частицами и нингидриновый реагент [186].

а. *Приготовление физиологических жидкостей для анализа. Мочу* человека [15] (после обессоливания, если это необходимо [45]) освобождают от аммиака. С этой целью добавляют к пробе 4*М* раствор гидроксида натрия до pH 11,7 и выдерживают 6 ч в вакуум-эксикаторе. Далее к пробе добавляют соляную кислоту до pH 2,2 и разбавляют полученный раствор до требуемого объема цитратным буферным раствором с pH 2,2. Авторы работы [15] брали 0,6 мл образца для анализа основных аминокислот и 0,2 мл — для анализа аминокислот нейтрального и кислотного характера. *Плазму крови* человека [15] приготавливали следующим образом. Центрифугировали [194] пробу крови, освобождали ее от белков с помощью пикриновой кислоты, избыток последней удаляли, фильтруя пробу через колонку с анионитом дауэкс 2-X8 (200—400 меш) в Cl^--форме. Доводили pH фильтрата до 8,0 и оставляли фильтрат на воздухе на 4 ч, чтобы цистеин окислился в цистин. После этого под-

Таблица 5.14

Состав цитратных буферных растворов и типы ионитов, применяемые в хроматографических анализах аминокислот, входящих в состав физиологических жидкостей

Характеристика буферного раствора[а]	Короткая колонка для анализа аминокислот основного характера. Натриевые буферные растворы (pH)			Длинная колонка для анализа аминокислот нейтрального и кислотного характера. Литиевые буферные растворы [14]		
	А [127]	Б [15]	В [15]	Г	Д	Е
pH[б]	2,2±0,03	4,26±0,02	5,28±0,02	2,20±0,03	2,80±0,01	4,15±0,01
Состав:						
Натрий, г-ион/л	0,20	0,38	0,36	—	—	—
Литий, г-ион/л	—	—	—	0,30	0,30	0,30
Цитрата натрия дигидрат, г	19,6	1490,0	1372,6	—	—	—
Цитрата лития тетрагидрат, г	—	—	—	14,1	60,2	112,8
Хлорид лития, г	—	—	—	—	23,8	—
Концентрированная соляная кислота, мл	16,5	609,0	260,0	13,0	47,0	54,0
Тиодигликоль, мл	20,0	—	—	10,0	10,0	10,0
Бриж-35 (50 г/100 мл), мл	2,0	80,0	80,0	—	—	—
Пентахлорфенол (50 мг/10 мл 96%-ного этанола), мл	—	—	—	0,05	0,40	0,40
Каприловая кислота, мл	0,1	4,0	4,0	—	—	—
Полный объем, л	1,0	40,0	40,0	0,5	4,0	4,0
Тип ионита[в]	Бекман, тип PA-36 X7,5; частицы размером 13±6 мкм			Бекман, тип PA-28 X7,5, частицы размером 16±6 мкм		

[а] А и Г — буферные растворы для растворения (разбавления) проб; Б, В, Д и Е — элюирующие буферные растворы. Если анализ ведется на короткой колонке, буферный раствор Г (в котором растворяют пробу для анализа на длинной колонке) можно применять вместе с буферным раствором А.

[б] Чтобы результаты разделения были воспроизводимыми, необходимо все время поддерживать величину pH в заданных пределах.

[в] Сульфированные стирол-дивинилбензольные катиониты со сферическими частицами.

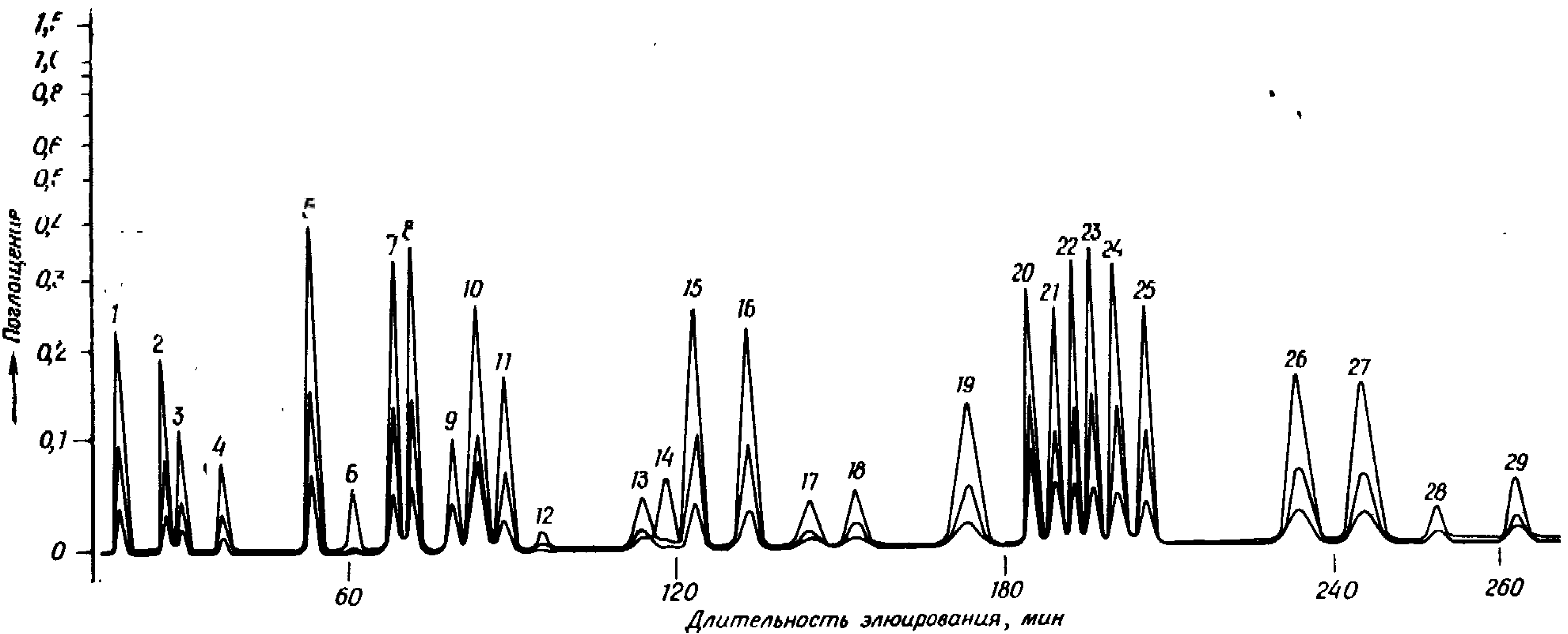


Рис. 5.26. Анализ искусственной смеси основных аминокислот, входящих в состав некоторых физиологических жидкостей, с использованием цитратных буферных растворов и нингидрина [15].

Колонка 0,9×22 см; ионит — сульфированный катионит бекман PA-35 (13±6 мкм); последовательное элюирование буферными растворами Б и В (табл. 5.14); продолжительность анализа 345 мин; обнаружение по поглощению нингидрина при 570 и 440 нм; скорость потока раствора нингидрина 25 мл/ч; анализатор Beckman Spinco Model-120C. Элюирование раствором Б: температура 33 °C, давление 14,3 атм, скорость потока 50 мл/ч, продолжительность элюирования 185 мин; элюирование раствором В: температура 55 °C. Выделены (в скобках указано число ммолей): *1* — фосфосерин (0,064), *2* — таурин (0,065), *3* — фосфоэтаноламин (0,063), *4* — мочевина (0,100), *5* — аспарагиновая кислота (0,100), *6* — оксипролин (0,100), *7* — треонин (0,100), *8* — серин (0,100), *9* — аспарагин (0,100), *10* — глутаминовая кислота (0,100), *11* — глутамин (0,146), *12* — саркозин (0,066), *13* — α-аминоадипиновая кислота (0,032), *14* — пролин (0,100), *15* — глицин (0,100), *16* — аланин (0,100), *17* — цитруллин (0,031), *18* — α-амино-*н*-масляная кислота (0,034), *19* — валин (0,100), *20* — цистин (0,100), *21* — цистатионин (0,065), *22* — метионин (0,100), *23* — изолейцин (0,100), *24* — лейцин (0,100), *25* — норлейцин (0,118), *26* — тирозин (0,100), *27* — фенилаланин (0,100), *28* — β-аланин (0,100), *29* — β-аминоизомасляная кислота.

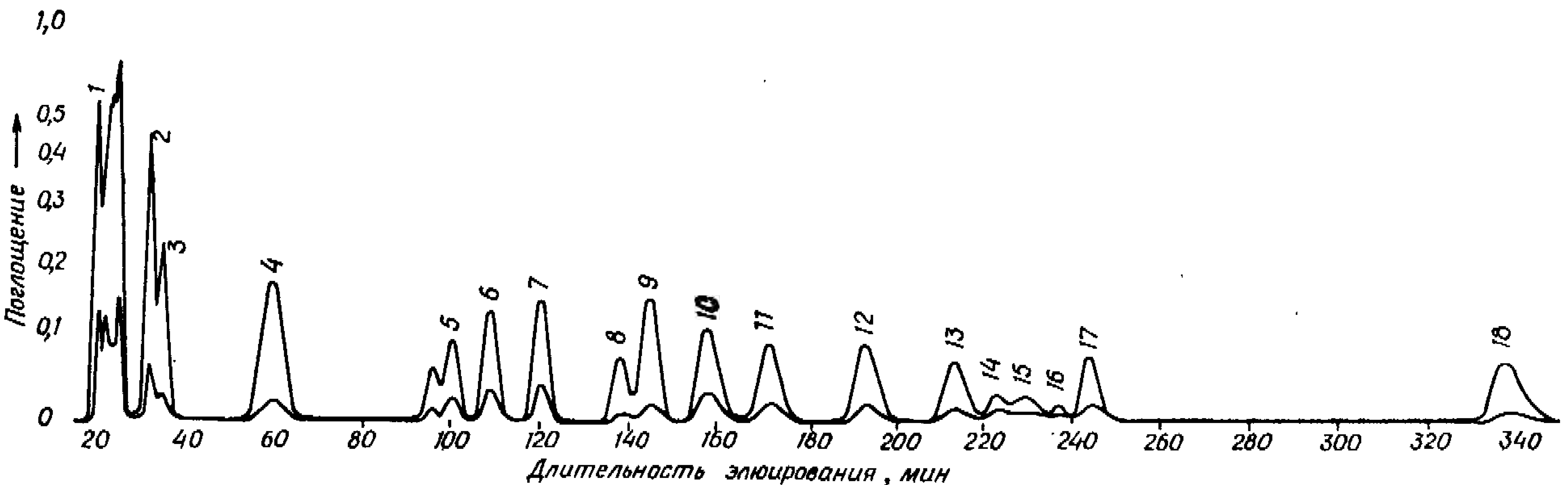


Рис. 5.27. Анализ искусственной смеси аминокислот нейтрального и кислотного характера, входящих в состав некоторых физиологических жидкостей, с использованием литиевых буферных растворов и нингидрина [14].

Колонка 0,9×55 см; ионит — сульфированный катионит бекман РА-28 (16±6 мкм); температура 37 °С (на протяжении всего анализа); скорость потока буферного раствора Д 70 мл/ч; скорость потока раствора нингидрина 35 мл/ч; давление 34 атм; спустя 270 мин после начала элюирования буферный раствор Д заменяют на буферный раствор Е; анализатор Beckman Spinco Model-120C. Выделены (в скобках указано число ммолей): *1* — кислотные и нейтральные аминокислоты, *2* — метионин, изолейцин, *3* — лейцин, *4* — тирозин, фенилаланин, *5* — оксилизин и аллооксилизин (0,149), *6* — γ-аминомасляная кислота (0,143), *7* — орнитин (0,149), *8* — этаноламин (0,143), *9* — аммиак (0,150), *10* — лизин (0,150), *11* — 1-метилгистидин (0,152), *12* — гистидин (0,150), *13* — 3-метилгистидин, *14* — ансерин (0,076), *15* — триптофан (0,074), *16* — креатинин (0,899), *17* — карнозин (0,138), *18* — аргинин (0,150).

кисляли раствор до pH 2,0 и разбавляли до требуемого объема цитратным буферным раствором с pH 2,2. Для анализа основных аминокислот использовали 1,7 мл полученного раствора, а для анализа аминокислот нейтрального и кислотного характера — 0,85 мл. Авторы работы [14] использовали другой метод приготовления плазмы крови — освобождение от белков по методике Герритсена и сотр. [59] 30-минутным центрифугированием при 8 °C на ультрацентрифуге типа Beckman L2-65 (с использованием «Type 65 angle headrotor») с ускорением 348 000 *g*.

б. Состав буферных растворов, приготовление ионитов и колонок. Состав буферных растворов и типы применяемых ионитов приведены в табл. 5.14. Ионит, из которого предварительно удаляют очень мелкие частицы, затрудняющие течение потока элюента, перемешивают с двукратным объемом буферного раствора Б и сразу же вводят в колонку. Соединения *основного характера разделяют* [15] на колонке 0,9×29 см, заполненной на 22 см ионитом. Разделение ведут при 33 °C при скорости потока элюента 50 мл/ч. Соединения *кислотного* и *нейтрального характера* [14] анализируют на Li^+-форме ионита. Поскольку фирмы поставляют ионит обычно в Na^+-форме, его промывают на воронке Бюхнера последовательно 10-кратным объемом 2%-ного раствора гидроксида лития, 10-кратным объемом деминерализованной воды и в заключение 10-кратным объемом стартового буферного раствора Д. Далее ионит смешивают с буферным раствором в отношении 1 : 3, полученную пасту оставляют на ночь, чтобы установилось равновесие. Готовым ионитом при 37 °C заполняют колонку размером 0,9×60 см на 55 см. После добавления каждой порции пасты ее сразу же перемешивают. Первой порции пасты дают осесть в колонке при закрытом на выходе из колонки кране, а при добавлении всех остальных порций через колонку пропускают со скоростью 70 мл/ч поток буферного раствора. Готовую колонку регенерируют 0,3 н. раствором гидроксида лития и выдерживают в течение часа, чтобы между ионитом и стартовым буферным раствором Д установилось равновесие.

в. Методика анализа. Если анализируются аминокислоты, пробу вводят в короткую колонку при температуре 33 °C (см. [186]). Включают насос для подачи в колонку стартового буферного раствора Б и нингидрина и включают самописец. Нулевая линия самописца должна установиться в течение 15 мин. На рис. 5.26 показана хроматограмма, полученная при разделении аминокислот основного характера, на рис. 5.27 — хроматограмма, полученная при разделении аминокислот нейтрального и кислотного характера на длинной колонке [14]. Скорость движения ленты самописца составляла примерно 15 см/ч, концент-

рация регистрировалась каждые 2 с. Продолжительность анализа до появления пика β-аминоизомасляной кислоты 4,5 ч.

Бенсон [16] усовершенствовал методику анализа аминокислот. Полученные им результаты (рис. 5.28) представляются весьма перспективными. Автор предполагает, что такая методика жидкостного хроматографического анализа в скором вре-

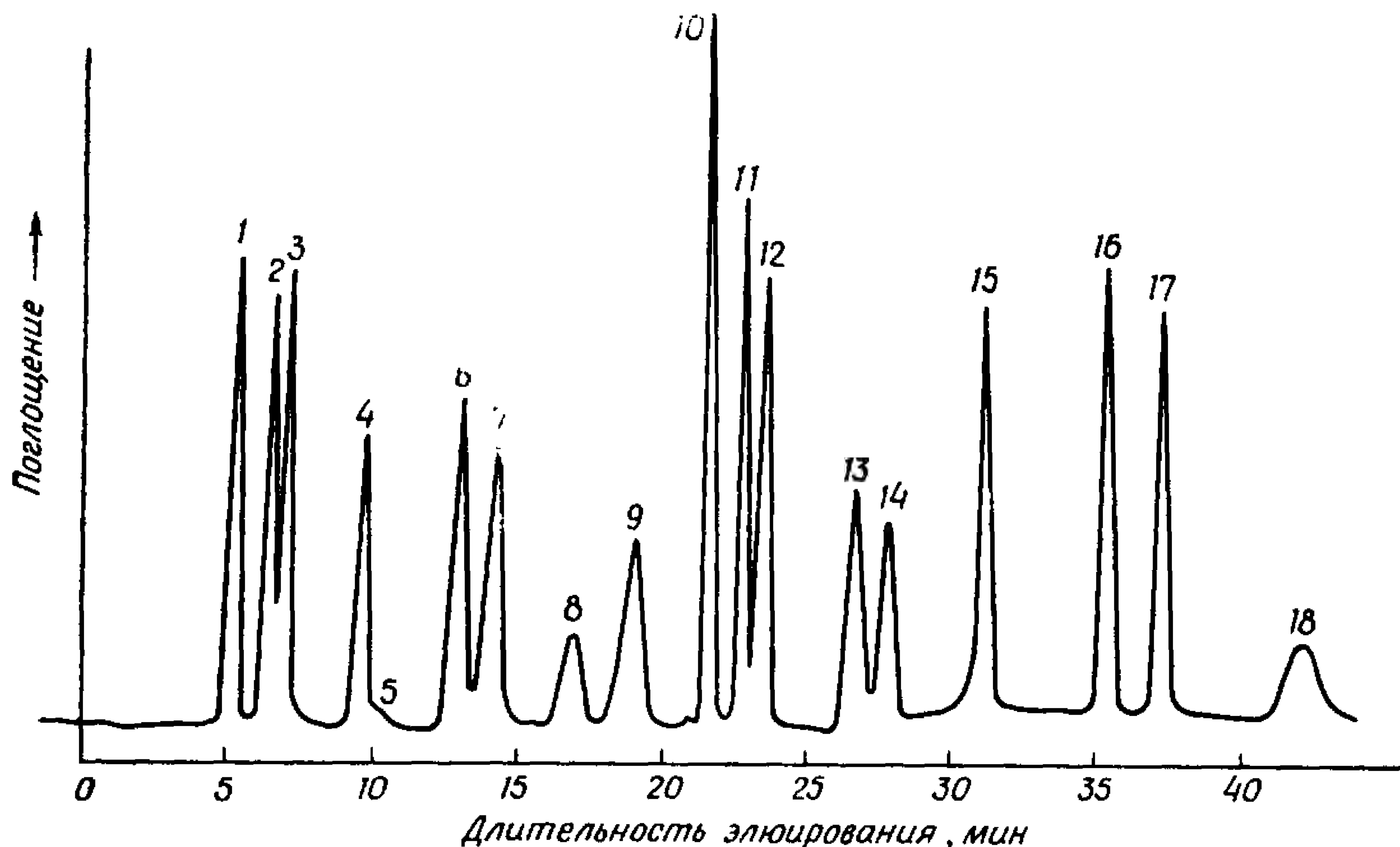


Рис. 5.28. Пример быстрого разделения на одной колонке искусственной смеси аминокислот, входящих в состав продуктов гидролиза белков, с помощью анализатора Durrum D-500 Analyser [16].

Колонка из нержавеющей стали, диаметр (внутр.) 1,75 мм; ионит — дуррум DC-A4 (8 мкм); проба — 10 нмоль смеси; буферный раствор очищали, пропуская через аммиачный фильтр, и пропускали через колонку равномерным потоком со скоростью 6—10 мл/ч; давление 83,5 атм. Результаты измерения поглощения элюата обрабатывали на ЭВМ PDP/8 с выводом результатов в цифровой и графической форме. ЭВМ осуществляла также управление всей установкой. Анализатор был оборудован охлаждаемым сборником фракций, рассчитанным на 80 фракций, которые отбирались автоматически. Один анализ, представленный на рисунке, длился 42 мин. На оси абсцисс показано отношение поглощения при 570 нм (аналитическая величина) к поглощению при 690 нм (сравнительная величина).

Выделены: *1* — аспарагиновая кислота, *2* — треонин, *3* — серин, *4* — глутаминовая кислота, *5* — пролин (570 нм), *6* — глицин, *7* — аланин, *8* — цистин, *9* — валин, *10* — метионин, *11* — изолейцин, *12* — лейцин, *13* — тирозин, *14* — фенилаланин, *15* — гистидин, *16* — лизин, *17* — аммиак, *18* — аргинин.

мени позволит проводить полный анализ смесей аминокислот менее чем за 30 мин. Несколько других примеров из области хроматографии аминокислот приведены в табл. 5.15.

Еще одно направление развития методов анализа аминокислот связано со значительным повышением чувствительности анализа. Повысить чувствительность анализа до уровня пикомолей [193] можно, в частности, применяя флуорескамин (флуорам™). Сам этот реактив не флуоресцирует, но его аминокислотные производные интенсивно флуоресцируют при УФ-облучении. В результате обнаруживать соединения можно,

Таблица 5.15

Список ряда работ, посвященных хроматографии аминокислот

Тема работы	Литература
Анализ	128, 186
Скоростной анализ	7, 65
Анализ на одной колонке	39, 47
Ультрамикроанализ	50а, 70а, 107, 111, 193
Оптимизация анализа и технические вопросы	13, 32, 112, 125
Разделение рацематов аминокислот	195
Препаративная хроматография аминокислот	75, 200
Лигандообменная хроматография	23, 62
Отделение аминокислот от пептидов	62, 117, 134, 212
Отделение сахаров от аминокислот	129, 192

изменяя интенсивность их флуоресценции, причем соответствующий прибор можно встроить в существующие анализаторы, предназначенные для колориметрирования после обработки нингидрином. Однако описанный метод непригоден для определения пролина и других иминокислот. Определить пролин можно с помощью недавно предложенной [50а] новой модификации этого метода. Пиридоксалевый метод обнаружения также предусматривает измерение интенсивности флуоресценции [70а]. Амины и аминокислоты обрабатывают пиридоксалем, образующиеся при этом основания Шиффа при восстановлении превращаются в пиридоксиламинокислоты, флуоресценцию которых и измеряют с помощью приспособленного для этой цели анализатора аминокислот. Если для восстановления применяется боротритид натрия $NaBT_4$, то образующиеся кислоты можно определять радиометрическим методом. Пиридоксалевый метод пригоден также для определения пролина. Список оригинальных работ по данной теме можно найти в библиографиях [40, 41].

5.10.2. ПЕПТИДЫ

В хроматографии пептидов, как и в хроматографии кислот, наблюдается тенденция к автоматизации анализа. Лишь в редких случаях такой анализ ведут с целью полного разделения смеси пептидов и их идентификации. В принципе подобный анализ можно вести так же, как и анализ аминокислот, т. е. путем повышения эффективности колонки и чувствительности обнаружения. Окрашенные продукты, образующиеся в результате обработки элюата нингидрином, характеризуются малым по-

глощением. Целесообразно предварительно провести щелочной гидролиз, поскольку производные нингидрина и выделяющихся в процессе гидролиза аминокислот характеризуются высоким поглощением. Однако в большинстве случаев цель анализа — выделение пептидов в чистом виде для их дальнейшего изучения. При этом измерить содержание пептидов в элюате физико-химическими методами (поглощение пептидной связи при 230 нм) невозможно, приходится делить элюат; небольшую его часть направляют в химический детектор непрерывного действия, а основную часть — в сборник фракций. Очень важна синхронизация работы сборника и самописца. Хилл и Деланей [72], а также Джонс [88] обобщили результаты работ по автоматической хроматографии пептидов.

Для проведения полуавтоматического анализа пептидов Шредер и сотр. [171, 172] пользовались автоматическим анализатором фирмы Technicon (Technicon Auto Analyser). Элюат из ионообменной колонки анализировали нингидриновым методом до и после щелочного гидролиза. Катравас [28] предложил методику полностью автоматизированного анализа также с использованием анализатора Technicon Auto Analyser в комбинации с принципом сегментированного потока по Скеггу [180]. Согласно этой методике, элюат делят на три потока. Два из них направляют в блок колориметра, где до и после щелочного гидролиза его обрабатывают нингидрином и колориметрируют, третий поток направляют в сборник фракций. Джонс [90] модифицировал эту методику. В предложенной им установке щелочной гидролиз ведут, прокачивая смесь через длинную тефлоновую спираль при температуре 100 °С, а перед колориметрированием раствор нейтрализуют. В установке Катраваса [28] поток прокачивается через колонку с высокой скоростью (250 мл/ч). Линдлей и Хейлетт [110] заполняли колонку ионообменными производными целлюлозы, обладающими удовлетворительной емкостью по отношению к пептидам.

Джонс [88] подробно описал установку для хроматографического анализа пептидов, пригодную как для препаративного (~100 мг), так и для аналитического (0,1—1 мг смеси пептидов) разделения. При работе на этой установке щелочной гидролиз не проводится. Эту методику называют «прямым методом нингидриновой колориметрии», поскольку в ней используется модифицированный [67, 150] аминокислотный анализатор Спакмана с сотр. [186], который можно непосредственно применять для автоматической хроматографии пептидов [89]. В установке можно использовать блоки различных автоматических анализаторов заводского изготовления. Разделение ведется методом градиентного элюирования. Элюат делится на две части, большая часть направляется в сборник фракций, а

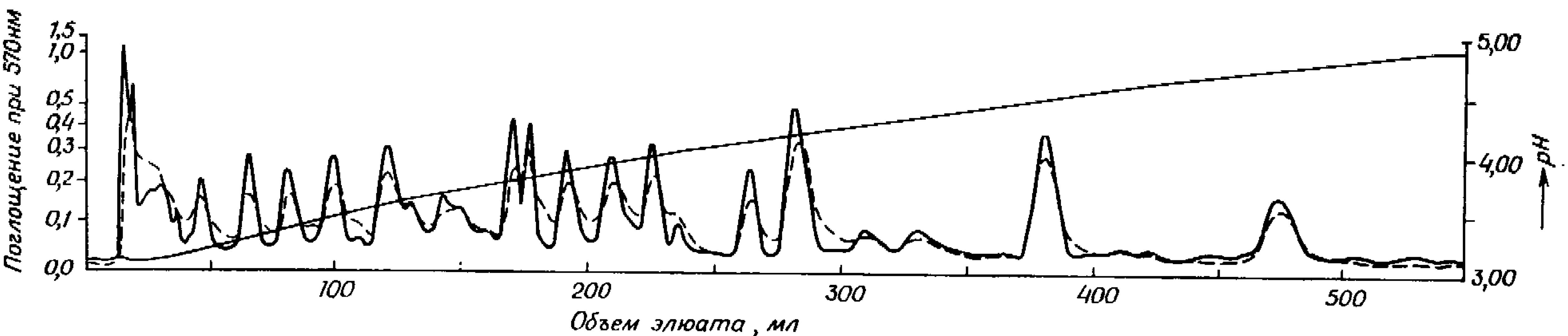


Рис. 5.29. Препаративная хроматограмма триптического гидролизата 100 мг аминоэтилированной β-цепи гемоглобина человека, полученная на автоматической установке с непосредственным колориметрическим обнаружением по нингидрину [88].

Колонка 0,9×18 см; ионит — сульфированный катионит спинко 15А; элюент — 250 мл 0,2М пиридин-ацетатного буферного раствора с pH 3,1 (в смесителе) и 250 мл 2,0 М пиридин-ацетатного буферного раствора с pH 5 (в резервуаре); линейное градиентное элюирование со скоростью потока в колонке 300 мл/ч; температура 50 °С; скорость вытекания элюата 2,0 мл/ч [при этом условии возможно непрерывное обнаружение по нингидрину (без гидролиза)]; длина оптического пути фотометра 4 мм.

меньшая используется для детектирования нингидриновым методом, причем перед детектированием она разбавляется. На рис. 5.29 показана хроматограмма, полученная при препаративном разделении на этой установке.

По мере развития современной биохимии все более очевидной становится необходимость разработки субмикрочувствительных методов. В качестве примера соответствующей работы

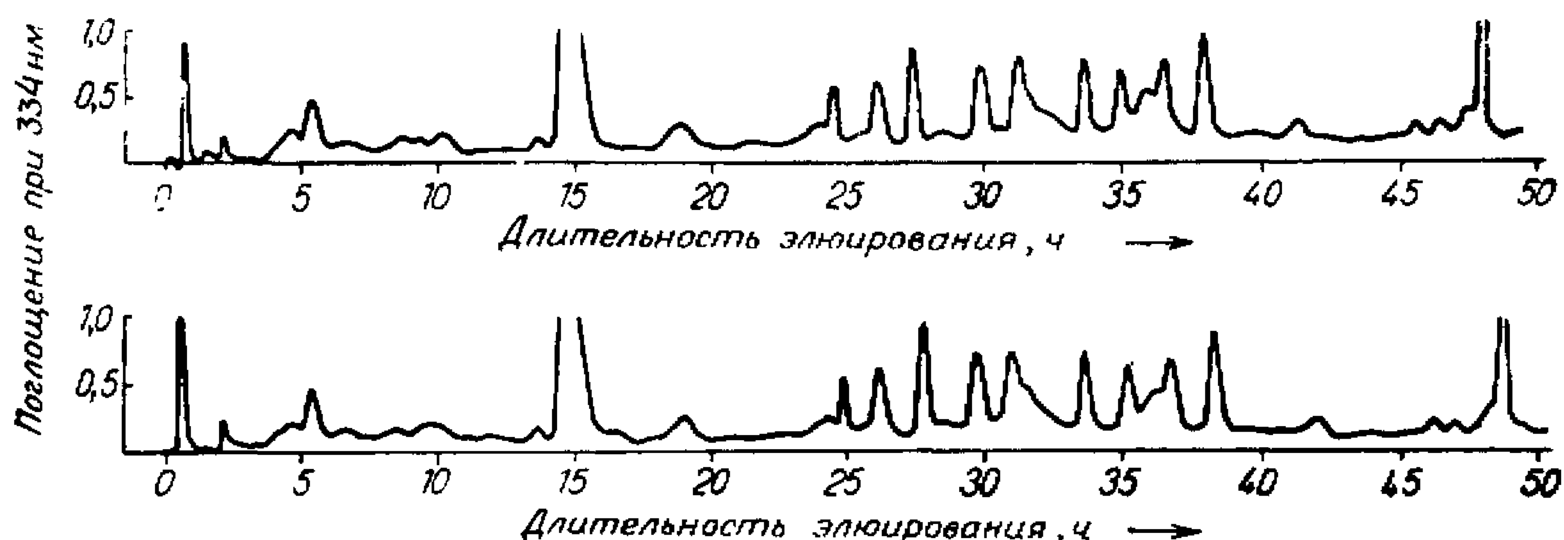


Рис. 5.30. Две автоматически снятые хроматограммы триптического гидролизата 30 нмолей β-лактоглобулина А [115].

Хроматограммы получены при разделении одного и того же материала, проведенном в идентичных условиях; они иллюстрируют воспроизводимость результатов анализа данным автоматическим хроматографическим микрометодом. Колонка 0,1×50 см; ионит — аминекс А6 (Bio-Rad). Для расщепления бисульфидных мостиков между пептидами в элюирующий буферный раствор добавляли дитиоэритрит в концентрации 0,05 моль/л. Детектирование велось с применением ТНБС. Условия анализа см. в тексте.

в области автоматической колоночной хроматографии пептидов следует отметить работу Махлейда и сотр. [115]. Эти авторы предложили методику, позволяющую работать с 10—200 нмоль соединения. Для анализа используется капиллярная колонка внутренним диаметром 1 мм и длиной 50—100 см (чаще всего 50 см) с насадкой из ионитов, выбираемых соответственно молекулярной массе анализируемых пептидов. *а*. Для анализа пептидов, содержащих до 30 аминокислотных остатков (мол. масса $\leqslant$3600), применяется сульфированный стирол-дивинилбензольный катионит аминекс А6 Х8 (Bio-Rad Lab.) с частицами размером 17,5±2 мкм. Элюирование ведут при градиенте концентрации и pH: в элюирующий цитратный буферный раствор (0,01—0,1М и pH 2,2—2,75) непрерывно подмешивают раствор гидроксида натрия, в результате чего величина pH возрастает до 6. Рабочая температура равна 50 °С. *б*. Высокомолекулярные пептиды (мол. масса >3600) разделяют на колонке, заполненной сильноосновным анионитом QAE-сефадекс А 25 (Pharmacia). Элюирование ведут 0,1М трис-HCl-буфером (pH 8,6) при линейном градиенте концентрации гидроксида натрия (0—0,5 или 1М). В процессе анализа слой ионита в колонке сжимается, поэтому после анализа и регенерации в нее следует добавить ионит. Рабочее давление составляет 5 атм. По-

Таблица 5.16

Список ряда работ, посвященных хроматографии пептидов

Тема работы	Литература
Фракционирование пептидов	76, 219
Препаративная хроматография с применением летучих буферных растворов	169, 170
Отделение пептидов и аминокислот от мочевины	62, 117, 134, 212
Автоматический колоночный анализ	12, 110, 138, 220
Обессоливание пептидов	74

глощение элюата измеряют либо непосредственно, либо непрерывно смешивают его с 2,4,6-тринитробензолсульфокислотой, которая при повышенных температурах реагирует с α- и ε-аминогруппами, образуя продукты, поглощающие при 334 нм. На рис. 5.30 показана хроматограмма, полученная описанным методом. Такой же чувствительный метод анализа аминокислот приведен в работе [107]. Несколько дополнительных примеров разделения пептидов указаны в табл. 5.16.

5.10.3. БЕЛКИ

Обычные стирол-дивинилбензольные иониты, как правило, непригодны для хроматографии белков, поскольку белки легко денатурируют в результате гидрофобного взаимодействия с матрицей ионита. Для этих целей более пригодны полимеры акриловой и метакриловой кислот (например, тонкоизмельченный амберлит IRC-50), матрица которых менее гидрофобна. По мнению Петерсона и Соубера [148, 184], лучше всего анализировать белки на ионообменных производных целлюлозы, а Порат и Линднер [157] предпочитают аналогичные производные полидекстрана.

В настоящее время в ионообменной хроматографии белков и ферментов применяются почти исключительно эти производные. Недавно для тех же целей были синтезированы ионообменные производные агарозы (см. табл. 5.6). Структура матриц этих ионов такова, что в нее легко проникают даже крупные макромолекулы, благодаря чему в ионном обмене участвуют группы, расположенные внутри зерен ионита. Теоретические основы хроматографии белков на ионитах рассматриваются Тизелиусом [211]. В ряде статей и монографий (некоторые из них указаны в табл. 5.13) описаны методы сорбции на ионитах и методы хроматографии белков. В большинстве случаев для хроматографии белков применяют DEAE-целлюлозу. После по-

явления SP- и QAE-сефадекса было обнаружено, что сильнокислотные и сильноосновные иониты этих типов обеспечивают эффективное разделение сложных белковых смесей. Большие надежды в настоящее время связывают с хроматографией на биполярных ионитах, разработанных Поратом и сотр. [153—156]. Применяемые для разделения биополимеров ионообменные производные с гидрофильной матрицей — производные целлюлозы, полидекстрана, агарозы — непригодны в условиях, характерных для современной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), поскольку при высоких давлениях колонки закупориваются. Для ВЭЖХ белков разработаны специальные ионообменные производные на основе жестких крупнопористых гидрофильных гелей, например сферон (см. табл. 5.6В, 6.3А и рис. 7.4). На этих сорбентах можно проводить ионообменное хроматографирование при высоких давлениях даже биополимеров [123а].

Как правило, разделение белков на ионитах происходит в результате ионных взаимодействий (разд. 5.4.2). Белки различных типов обладают различными биологически важными функциями: метаболическими, ингибиторными, регуляторными и другими, т. е. обладают свойствами, необходимыми для биоспецифических взаимодействий. Эти свойства можно использовать для разделения белков методом не только аффинной хроматографии (см. гл. 7), но и ионообменной. Как показал Погелл [150а], для ускорения элюирования ферментов из слоя ионита можно использовать тонкие конформационные изменения, вызываемые в макромолекулах фермента субстратом или ингибитором. С этой целью, в частности, насыщенный препаратом фермента слой ионита промывают буферными растворами возрастающей элюирующей силы (градиент ионной силы). После того как элюирующая сила буферного раствора приблизится к такому значению, при котором начнется элюирование собственно фермента, ее перестают повышать и продолжают элюирование до тех пор, пока из колонки начнет элюироваться чистый буферный раствор; фермент при этом остается в колонке. Однако, если к буферному раствору того же состава добавить субстрат или ингибитор, начинается селективное элюирование данного фермента. Происходящие при этом конформационные изменения, в процессе которых блокируется часть поверхности фермента, во многих случаях приводят к расщеплению связи фермента с ионитом, и происходит селективное элюирование, т. е. отделение фермента от других белков. Погелл [150а] называет этот метод *субстратным,* или *специфическим, элюированием,* а Ван дер Хаар [217] — *аффинным элюированием.* Фактически этот процесс представляет собой классическую десорбцию биологически активных соединений из ионитов, ускоренную биоспецифи-

ческими взаимодействиями. Преимущество этого метода по сравнению с аффинной хроматографией (гл. 7) в том, что для него не требуется ковалентного связывания аффинных лигандов со специальным носителем. Проводить такое разделение можно на обычных колонках для ионообменной хроматографии.

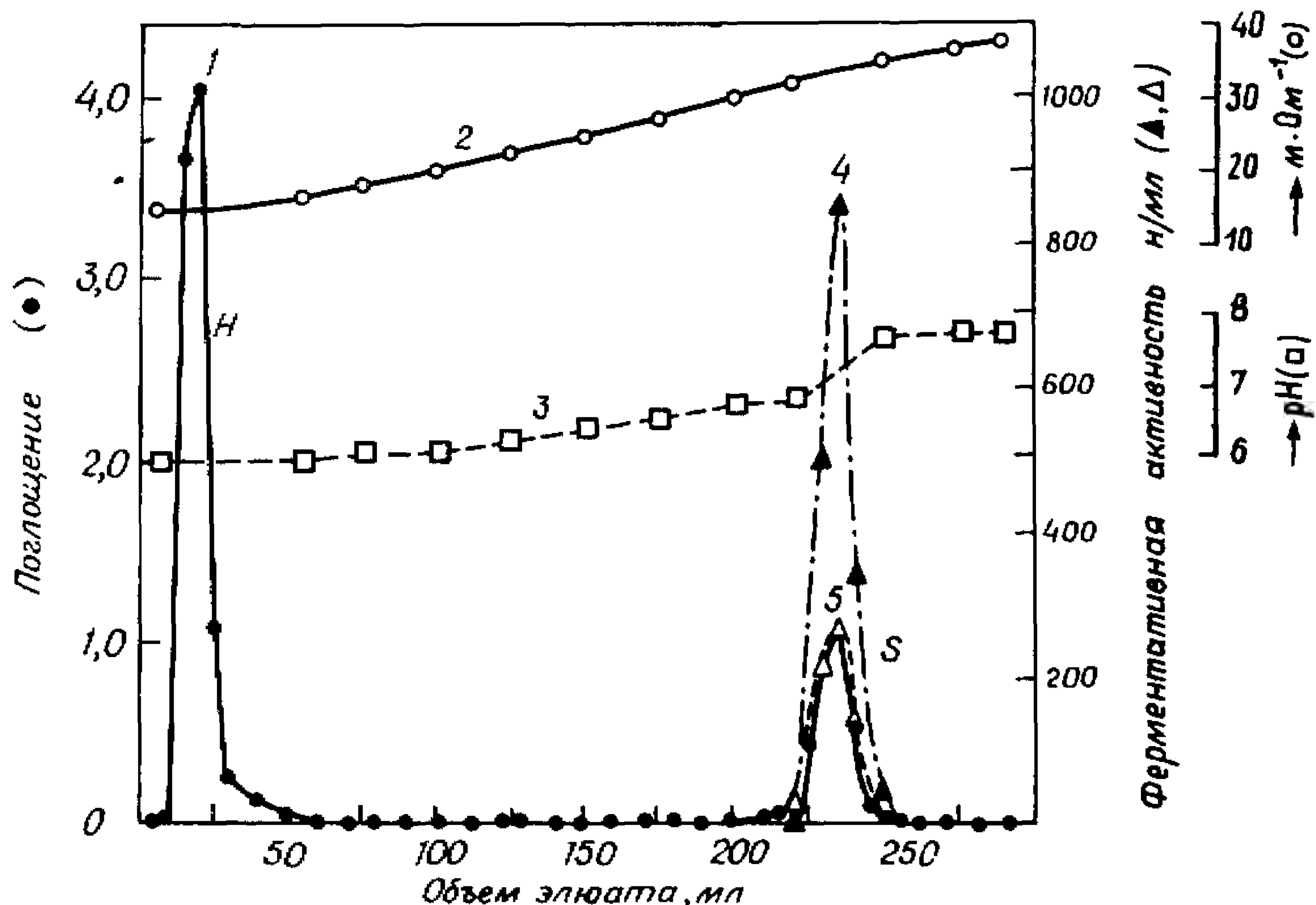


Рис. 5.31. Хроматограмма продуктов переваривания субтилизином стафилококковой нуклеазы (проведенного в присутствии лиганда), полученная на колонке с фосфоцеллюлозой [203].

Колонка 1×7 см, ионит — фосфоцеллюлоза (Whatman, Chromedia, P1), приведенная в состояние равновесия с 0,3М раствором ацетата аммония (pH 6); элюент — 150 мл указанного выше раствора и 150 мл 1М раствора ацетата аммония (pH 8); градиентное элюирование с применением устройства Varigrad; скорость потока 50 мл/ч; температура 4 °С; проба — раствор исследуемой смеси в 3 мл первого буферного раствора; объем отбираемых фракций 5 мл; обнаружение: *1* — по поглощению при 280 нм; *2* — по электропроводности; *3* — по изменению pH; *4*, *5* — по ферментативной активности [33] по отношению к дезоксирибонуклеиновой (*4*) и рибонуклеиновой (*5*) кислотам. *H* — продукт гидролитического расщепления нуклеазы *S*.

Примером использования ионообменной хроматографии для изучения свойств ферментов может служить работа Таниуши и сотр. [203]. Нуклеаза стафилококка представляет собой фермент, 149 аминокислот которого связаны в единую пептидную цепь без дисульфидных мостиков. Этот свободный фермент легко расщепляется различными протеазами, вызывающими его дезактивацию и деградацию на пептиды и аминокислоты. В присутствии лиганда дезокситимидин-3′,5-дифосфата (pdTp) и ионов Ca^{2+} значительно повышается устойчивость фермента по отношению к денатурации и уменьшается степень его расщепления протеазами. Термолизин вовсе не расщепляет этот фермент, а трипсин, химотрипсин и субтилизин расщепляют его

лишь в ограниченной степени, вызывая образование ферментоактивных нуклеаз с обычной или слегка пониженной активностью и расщепляя пептидную цепь лишь в немногих местах (образуются так называемые нуклеазы T, C и S). Сопротивляемость фермента, обеспечиваемую данным лигандом, можно объяснить происходящими конформационными изменениями

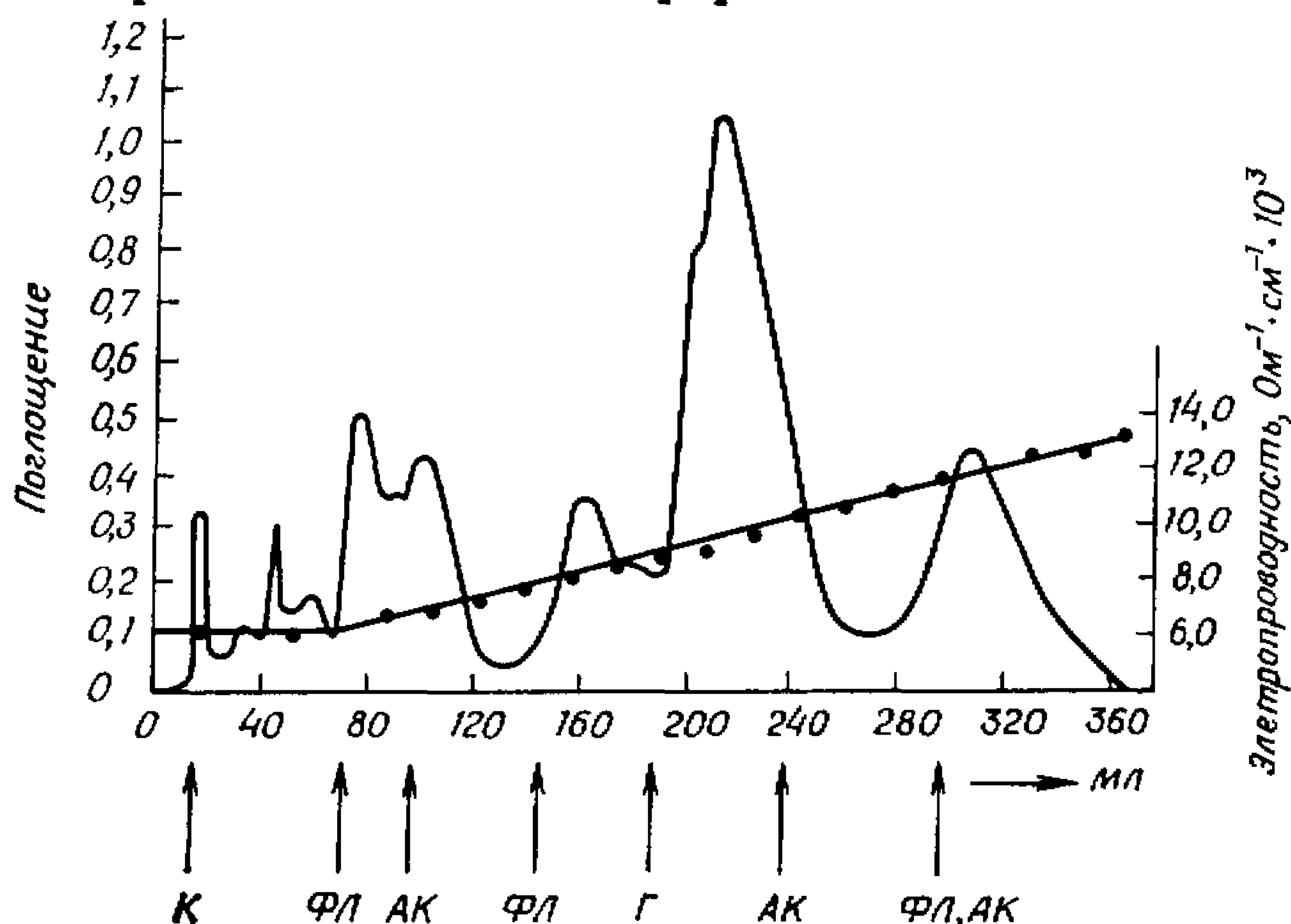


Рис. 5.32. Хроматограмма яда кобры (*Naja nigricollis*), полученная на биполярном анионите [156].

Колонка 1×58,5 см; ионит — β-аланин — сефадекс G-75 (емкость 750 мкэкв./г), приведенный в состояние равновесия с 0,08М раствором ацетата аммония (рН 6); элюаты — указанный раствор и 0,2М раствор ацетата аммония (рН 6); линейное градиентное элюирование (ход градиента показан прямой на рисунке); скорость потока 6,2 мл/ч; проба — 100 мг обессоленного яда; объем отбираемых фракций 3,4 мл; изменения рН элюата не наблюдалось. К — коагулянт, ФЛ — фосфолипаза, АК — антикоагулянт, Г — гиалуронидаза.

при взаимодействии фермента с лигандом и с ионами кальция.

Другой пример — хроматография на фосфоцеллюлозе [202, 203] продуктов переваривания стафилококковой нуклеазы субтилизином в присутствии упомянутых выше стабилизаторов. Нуклеазу (35 мг) растворяют в 3,5 мл 0,05М раствор бикарбоната аммония с рН 8, содержащего хлорид кальция (0,01М) и 3,5 мг pdTp. Полученный раствор обрабатывают 35 мкл свежеприготовленного 1%-ного раствора субтилизина и выдерживают 3,5 ч в термостате при 25 °С. Дигерирование останавливают, высушивая раствор при температуре ниже 0 °С. Высушенный образец растворяют в 3 мл первого элюирующего раствора (0,3М раствор ацетата аммония, рН 6) и вводят в колонку (рис. 5.31). Активный хроматографический пик *S*, занимающий обычное для нативной нерасщепленной нуклеазы положение, содержит 57% фермента (определено по поглощению). Фракции соответствующей хроматографической зоны соединяют и

лиофилизуют. Этот материал получил название «нуклеаза S». Дальнейший анализ показал, что он представляет собой смесь двух соединений, состоящих из пептидных цепей, содержащих аминокислотные остатки с 5 по 149 и с 6 по 149. Активность этих ферментов с укороченными цепями остается такой же, как и у исходной цепи нуклеазы, т. е. содержащей аминокислотные остатки с 1 по 149. Следовательно, N-терминальный пептид, содержащий аминокислоты с 1 по 4 или с 1 по 5, не

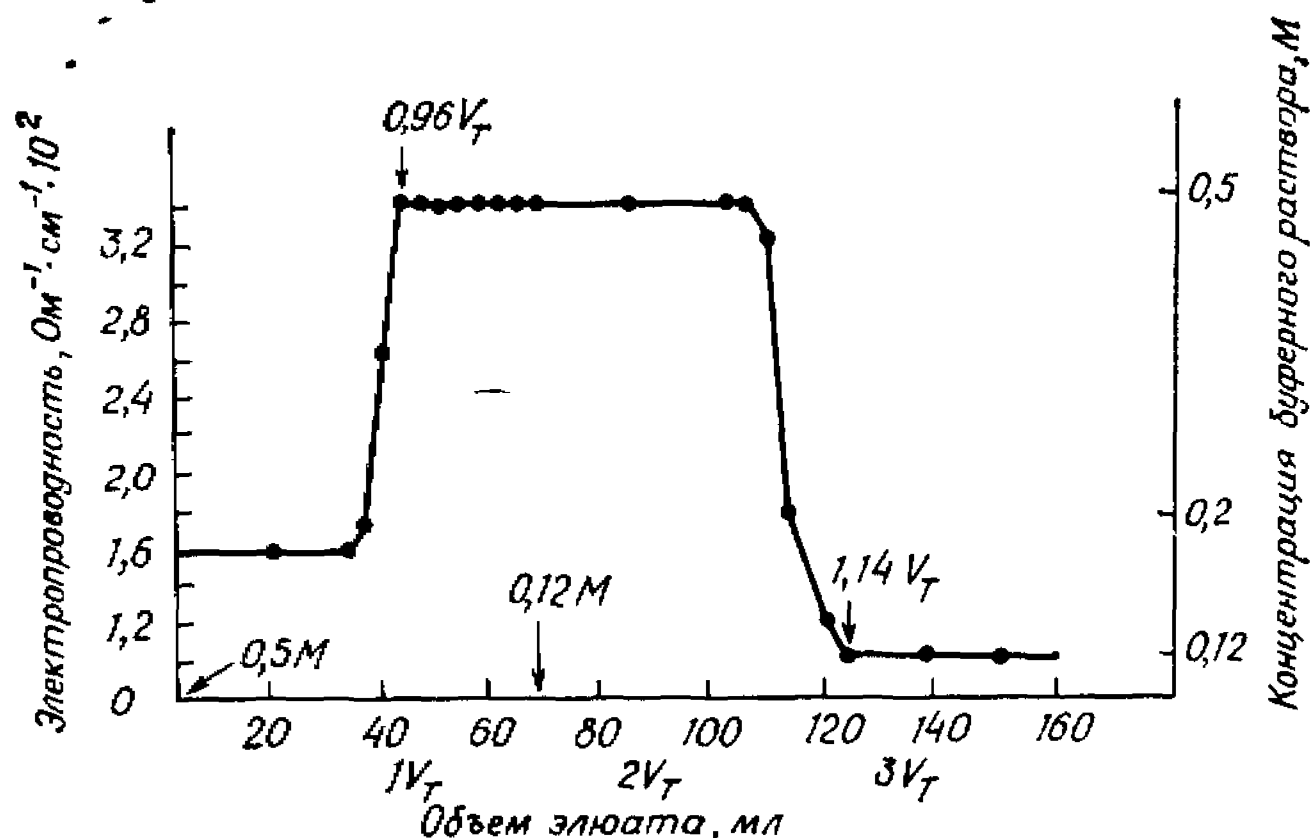


Рис. 5.33. Регенерирование и приведение в равновесное состояние биполярного ионита, на котором проведено разделение, показанное на рис. 5.32 [156].

Ионит приводят в состояние равновесия со вторым буферным раствором (0,2М раствор ацетата аммония, pH 6), далее (начало кривой) добавляют к иониту 70 мл регенерирующего буферного раствора (0,5М раствор ацетата аммония, pH 6) и через некоторое время (вторая стрелка) вводят в колонку 0,12М раствор ацетата аммония (pH 6). Общий объем слоя V_T=46,2 см^3.

влияет на ферментные свойства нуклеазы. Неактивный хроматографический пик H (рис. 5.31) соответствует смеси небольшого количества в значительной степени расщепленного субстрата и других продуктов переваривания, поглощающих свет.

Приведем еще один пример, демонстрирующий применение биполярного ионита. Порат и Фриклунд [156] применяли хроматографию на биполярном ионите для фракционирования яда змеи *Naja nigricollis*. Ионит приготавливали путем связывания β-аланина с сефадексом G-75 после активации последнего бромцианом, проведенной по методике, описанной в разд. 7.2. Результаты фракционирования показаны на рис. 5.32. Последующее регенерирование колонки и приведение биполярного ионита к равновесию демонстрируется на рис. 5.33. Некоторые примеры хроматографии белков даны в табл. 5.17. Большое число ссылок на работы по применению ионообменной хроматографии для разделения белков и ферментов можно найти в библиографиях [40, 41].

Таблица 5.17

Список ряда работ, посвященных хроматографии белков и ферментов

Тема работы	Литература
Хроматография на целлюлозных и полидекстрановых ионитах	148, 149, 154, 184, 207
Хроматография на биполярных ионитах	153—156
Хроматография ферментов	10, 121, 160, 204
Препаративное и аналитическое разделение	37, 108, 130, 158
Автоматический анализ	10, 51, 58, 82, 204, 216
Высокоскоростная хроматография с применением ионообменных производных твердых гидрофильных гелей	123а
Субстратное (специфическое или аффинное) элюирование	150а, 184а; 217

5.10.4. ФРАГМЕНТЫ ОБОЛОЧЕК КЛЕТОК МИКРОБОВ

Бактериолитические пептидазы способны расщеплять некоторые пептидные поперечные связи между пептидоглисановыми нитями оболочек клеток микробов. При этом материал оболочки переходит в раствор. Типпер и сотр. [210] изучали действие пептидаз из питательной среды штамма *Myxobacter* на изолированные оболочки клеток *Staphylococcus aureus* и *Arthobacter crystallopoientes*. Ниже описан пример фракционирования на ECTEOLA-целлюлозе жидкости, полученной в результате специальной обработки оболочек клеток *S. aureus*.

Оболочки клеток. *S. aureus* приготавливали из клеток в периоде роста после логарифмической фазы по методике, описанной в работах [49, 60]. В процессе их механического разделения поддерживалась низкая температура и pH около 5. После первой промывки автолитические ферменты инактивировали, нагревая 20 мин на водяной бане при pH 5. Выделенные в виде порошка из ацетоновой среды оболочки клеток *S. aureus* обрабатывали 2 ч трипсином и рибонуклеазой в 0,05*М* фосфатном буферном растворе при pH 7,4, после чего лиофилизовали. Для расщепления оболочек применяли обогащенный в 632 раза препарат фермента из штамма *Myxobacter*, приготовление которого описано в работах [49, 50]. Оболочки клеток *S. aureus* (345 мг) обрабатывали раствором 0,46 мг фермента в 7 мл 0,02 *М* буферного раствора веронал-натрия с начальным pH 8,9. В процессе лизирования величина pH быстро падала, и через 4 ч ее корректировали, добавляя 0,5 мл 1*М* раствора гидроксида натрия; в дальнейшем величина pH не менялась. Обработку прекращали через 21 ч, раствор нейтрализовали

1 *M* соляной кислотой до pH 5,5 и разбавляли до объема 15 мл, чтобы снизить концентрацию соли в нем до 0,04*M*. Полученную смесь разделяли хроматографированием на ECTEOLA-целлюлозе (Bio-Rad Cellex E) (рис. 5.34). Ионит предварительно тщательно промывали 0,5*M* раствором хлорида лития, а потом водой до полного исчезновения солей из элюата. Объединенные фракции *1*, *2* и *3* (рис. 5.34) обессоливали и вновь разделяли на сефадексе и СМ-целлюлозе. В результате изучения

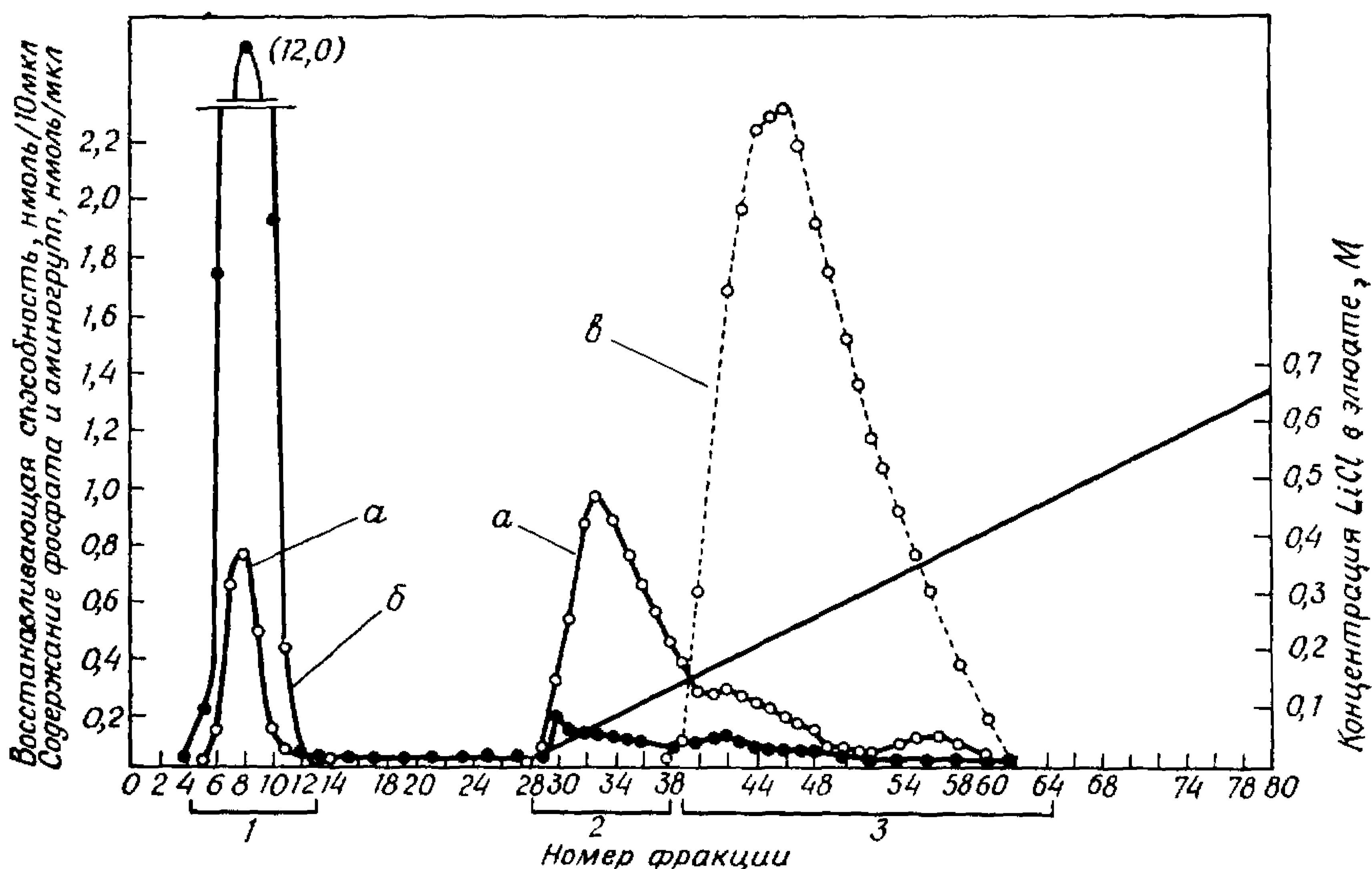


Рис. 5.34. Фракционирование пептидазного гидролизата оболочек клеток *Staphylococcus aureus* на ECTEOLA-целлюлозе [210].

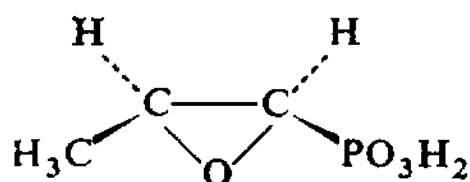
Колонка 3×23 см; элюенты — вода и хлорид лития, линейное градиентное элюирование (после выделения 28-й фракции градиент вычислялся по объему элюента, введенного из резервуара); скорость потока 1 мл/мин; температура комнатная; проба — весь раствор продуктов гидролиза (15 мл, pH 5,5); объем отбираемых фракций 15 мл; обнаружение [50, 60, 209, 210]: *а* — по восстановительной силе, *б* — по числу свободных аминогрупп, *в* — по полному содержанию фосфата.

выделенных полисахаридов, аминокислот и пептидов предложена структура оболочки клетки *S. aureus*. Аналогичные исследования проведены для изучения структуры оболочек клеток *A. crystallopoientes*.

5.10.5. АНТИБИОТИКИ

Чайет и сотр. [29] описали несколько методик выделения (с использованием ионообменной, гель-проникающей, адсорбционной и тонкослойной хроматографии) антибиотика фосфономицина из продуктов ферментации стрептомицетов в жидкой

среде. Ниже описаны методики выделения с применением ионообменной хроматографии. Фосфономицин представляет собой (—)-*цис*-1,2-эпоксипропилфосфиновую кислоту



а. Сорбция на аноните и десорбция. Питательная жидкость после фильтрации под давлением содержала 13,4 мг/мл сухого

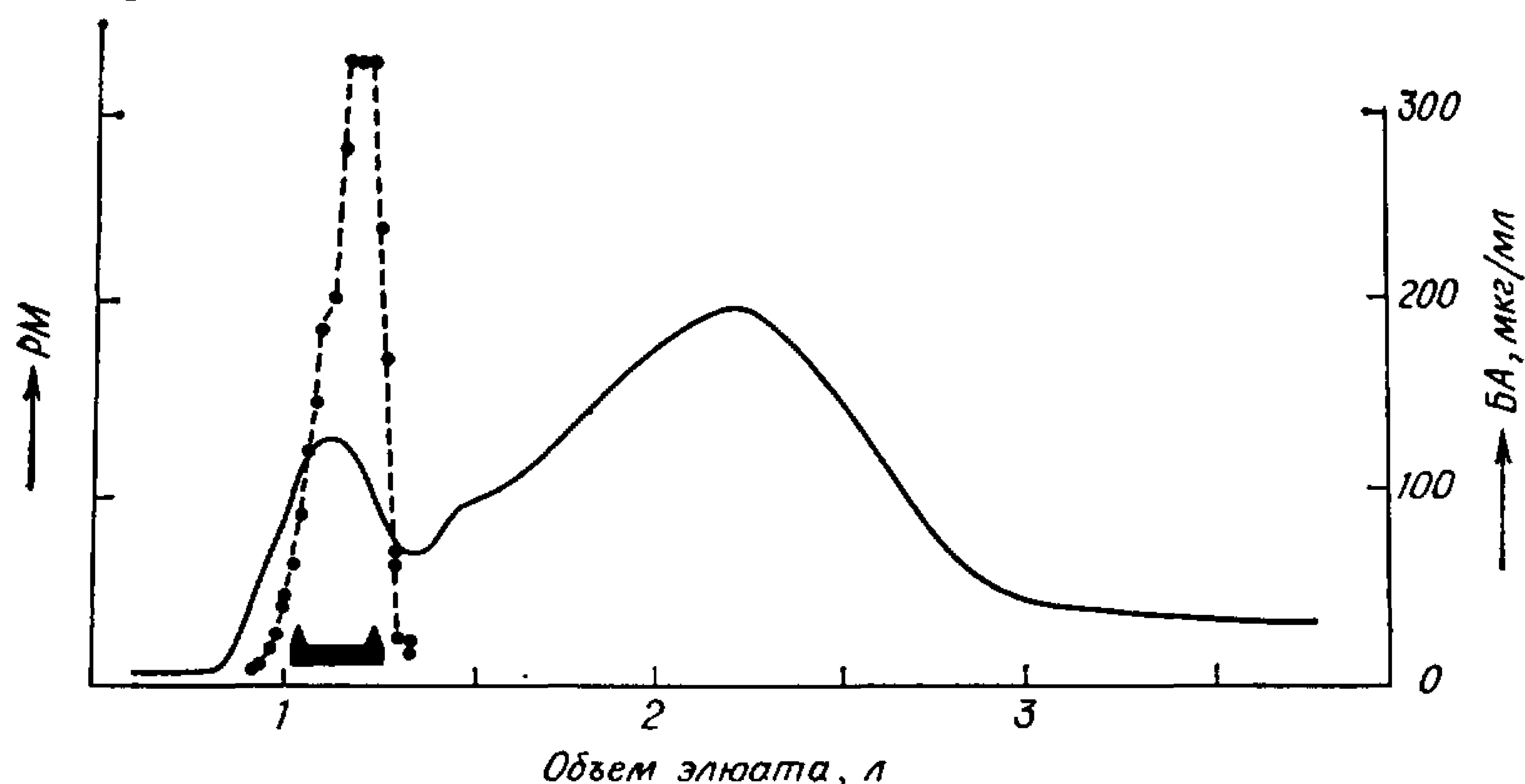


Рис. 5.35. Концентрирование фосфономицина методом катионообменной хроматографии [29].

Колонка 5,3×113 см; ионит — дауэкс 50-Х2 (50—100 меш) в H^+-форме, промытый водой; элюат — вода; скорость потока 19 мл/мин; проба — 100 мл водного раствора десорбата, содержащего 10 г сухого материала; объем отбираемых фракций 20,5 мл; обнаружение — рефрактометрическим методом (РМ) и по биологической активности (БА) (в последнем случае фракции титровали 0,1 M NaOH и затем определяли биологическую активность).

остатка, в том числе 2,4 мкг/мл фосфономицина; таким образом, чистота антибиотика составляла 0,02%. 400 мл фильтрата, приведенного к pH 7, сорбировали на 30 л (толщина слоя 75 см) анионита дауэкс 1-Х2 в Cl^--форме (размер частиц 50—100 меш). Фильтрат пропускали через слой ионита со скоростью, равной одному объему ионита за 10 мин. Жидкость, прошедшую сквозь слой ионита и содержащую менее 10% антибиотика, сливали, а слой ионита с сорбатом промывали водой. Десорбцию вели 3%-ным раствором хлорида аммония в 90%-ном метаноле. Отбирали фракции объемом 7,5 л и проводили их биологический анализ. Фракции *4* и *5* показали максимальную активность, поэтому их соединяли и концентрировали при пониженном давлении до объема 1,4 л. Полученный продукт содержал 250 л сухого вещества, в том числе 0,86 г фосфономицина. Таким образом, выход фосфономицина составлял 90%, а степень его чистоты равнялась 0,3%. Полученный десорбат использовали для дальнейших экспериментов.

б. Концентрирование методом катионообменной хроматографии. Водный раствор десорбированного антибиотика обогащали с помощью хроматографии на катионите (рис. 5.35). В каждом цикле разделения собирали фракции *52—62,* полный объем которых составлял 240 мл. Проводили 6 таких циклов. Эти фракции лиофилизовали и получали 4,7 г концентра-

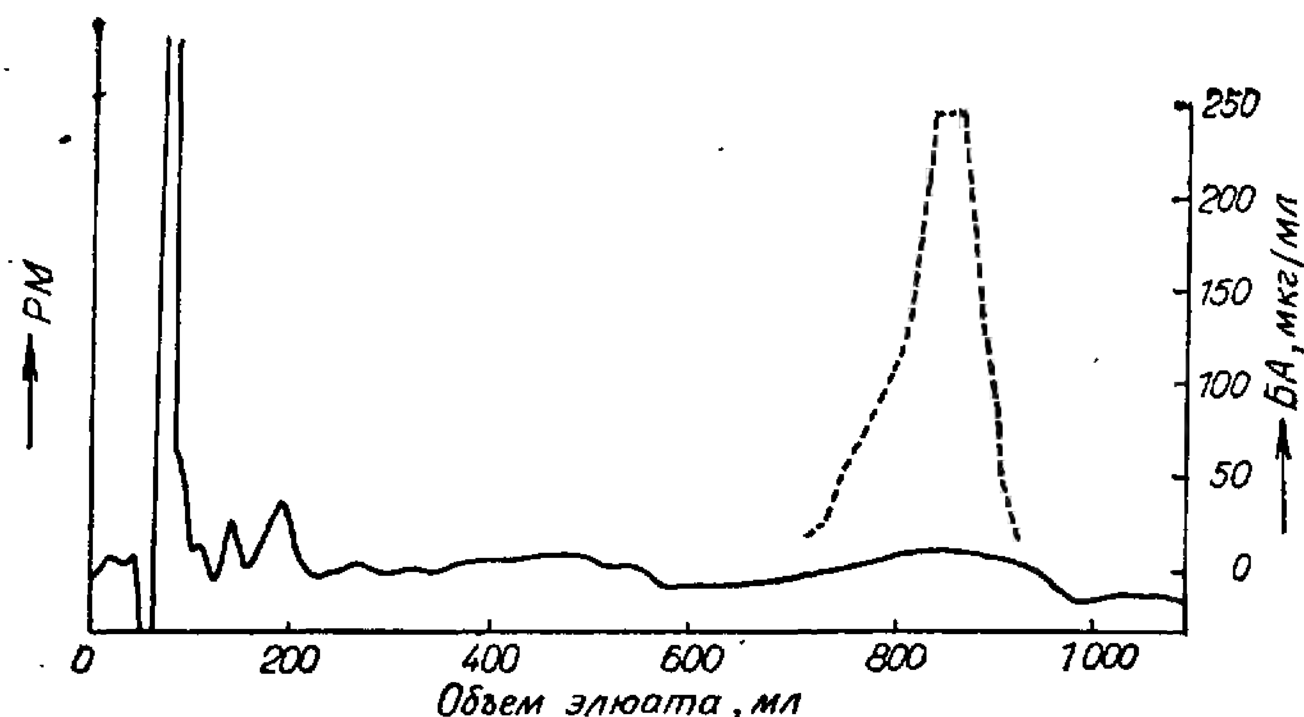


Рис. 5.36. Повторное хроматографирование фосфономицина на анионите [29]. Колонка 1,4X82 см; ионит — 125 мл дауэкса 1-Х2 (200—400 меш), приведенного в состояние равновесия с буферным раствором 0,05 М пиридин — HCl (pH 5,0); скорость потока 1 мл/мин; проба — концентрат антибиотика (444 мг), растворенный в 1—2 мл воды; объем отбираемой фракции 5 мл. Остальные условия хроматографирования см. в подписи к рис. 5.35.

та чистоты 7% (выход 52%). Успеху анализа способствовали быстрота проведения операций и нейтрализация отбираемых фракций, поскольку данный антибиотик чувствителен к кислой среде. По этой причине десорбаты, содержащие минеральные соли, которые разлагаются на катионите, и понижающие pH элюата, нельзя хроматографировать описанным методом. В процессе хроматографирования происходит частичное раскрытие эпоксидного кольца с образованием гликольного производного, которое обладает аналогичными хроматографическими характеристиками и снижает чистоту продукта.

в. Повторное хроматографирование на анионите. Концентрат чистоты 5—7%, приготовленный с использованием катионита (описано в п. «*б*»), обогащали, хроматографируя на анионите (рис. 5.36). Сравнительную ячейку рефрактометра заполняли буферным раствором. Разрыв рефрактометрической кривой (рис. 5.36) был вызван присутствием воды, используемой для растворения концентрата, и, таким образом, соответствовал мертвому объему колонки. Первый хроматографический пик — буферный раствор, вытесненный из ионита в процессе сорбции пробы. Соединенные активные фракции обессоливали методом гель-проникающей хроматографии на биогеле

Р-2 и лиофилизовали. Выход продукта составлял 62 мг антибиотика чистоты 33%, т. е. равнялся 90%.

г. Дальнейшая очистка. В работе [29] описаны методы дальнейшей очистки, упомянутые во введении к данному разделу, и проведена их сравнительная оценка. Весьма эффективной процедурой обогащения оказалась адсорбция и повторное хроматографирование на оксиде алюминия с последующей кристаллизацией. Она обеспечивает 5000-кратную очистку при выходе продукта 12%.

5.10.6. ВИТАМИНЫ

Диорио и Левин [42] применяли элюирование с линейным концентрационным градиентом соляной кислоты для разделения пиримидиновых предшественников тиамина, сорбированных на сульфированном катионите. Некоторые тиамин-зависимые штаммы *Neurospora crassa* допускают соединения, которые способны удовлетворить потребностям штамма *Enterobacter aerogenes* PD1 в азоте пиримидиновой части молекулы тиамина. Эти соединения детектировали биологическими методами с использованием *E. aerogenes*. Их выделяли, очищали и идентифицировали химическими методами, а также с помощью микробиологических анализов. В результате изучения состава предшественников был предложен возможный метод биосинтеза пиримидиновой части молекулы тиамина. Хроматографический раздел этого исследования посвящен концентрированию активного материала и хроматографическому фракционированию.

а. Концентрирование пиримидиновых предшественников. 10 л отфильтрованной питательной среды культуры *N. crassa* перемешивали с 350 г хорошо промытого катионита дауэкс AG-50WX8 (100—200 меш) в H^+-форме в течение часа. Далее жидкость отфильтровывали, промывали ионит четырьмя литровыми порциями дистиллированной воды и элюировали 2М раствором аммиака. Элюат, содержащий биологически активный материал, высушивали при пониженном давлении и растворяли в 100 мл дистиллированной воды. В полученный раствор добавляли 10 г тщательно приготовленного анионита дауэкс AG1-X10 (100—200 меш) в OH^--форме, встряхивали смесь 20 мин и затем фильтровали. После этого ионит промывали двумя 10-литровыми порциями дистиллированной воды, соединяли промывные воды с фильтратом и замораживали концентрат. Полученный концентрат, содержащий все 4 предшественника, хранили при —15 °С.

б. Колоночное фракционирование концентрата. Результаты разделения представлены на рис. 5.37. Растворы полученных

фракций концентрировали при пониженном давлении и хранили при —15 °C.

в. Дальнейшее фракционирование. Проведенные исследования позволили авторам предложить следующую систему реак-

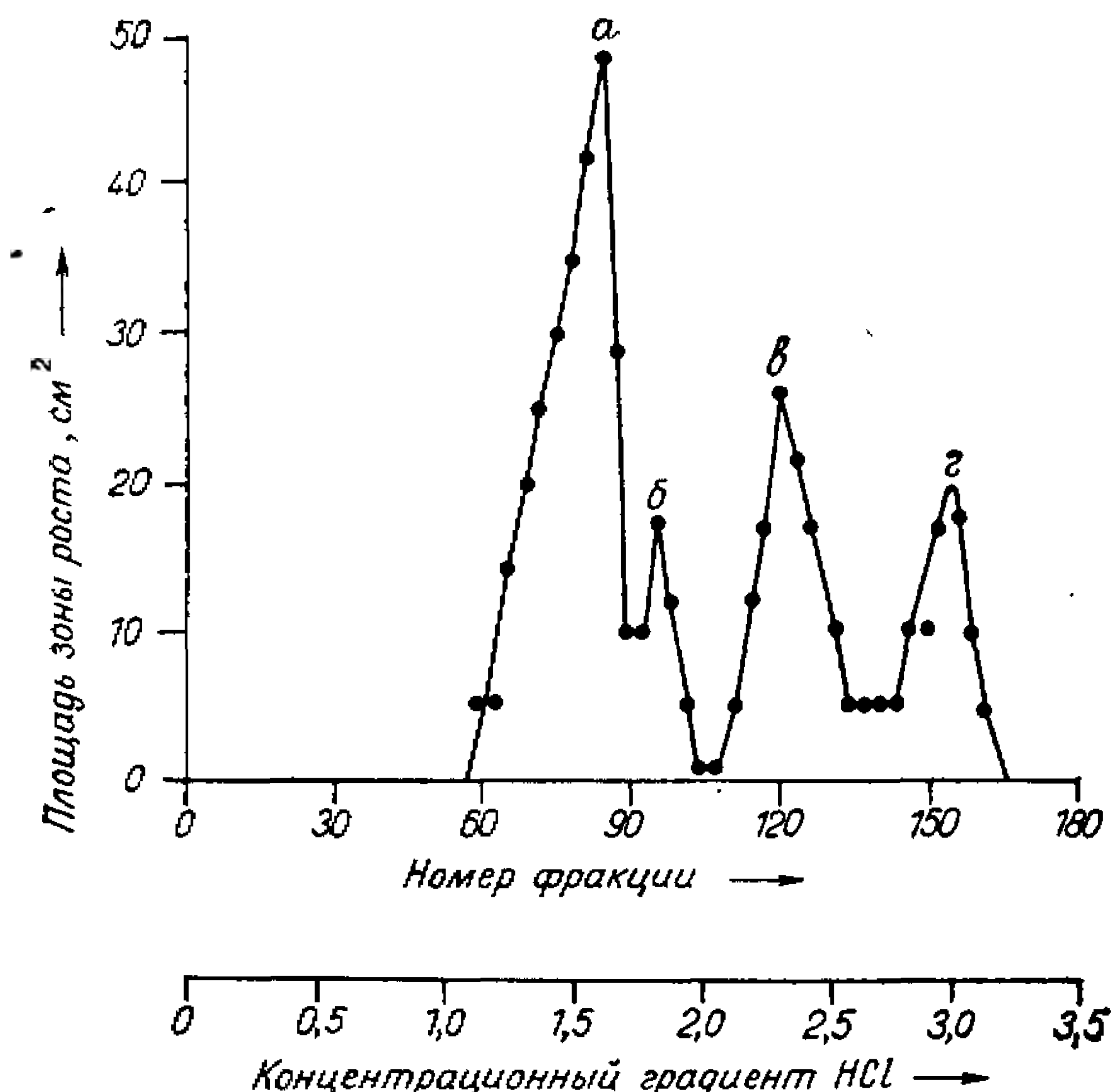
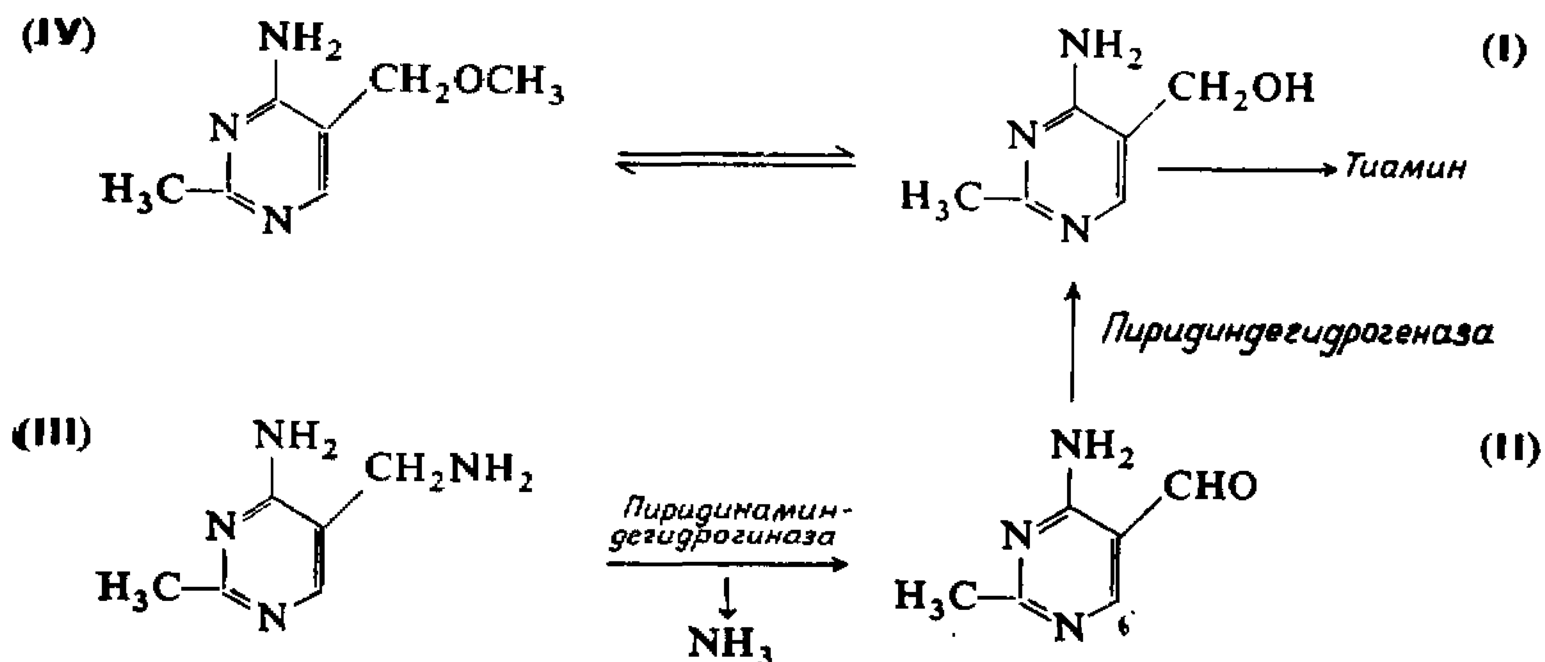


Рис. 5.37. Хроматография пиримидиновых предшественников тиамина на катионите [42].

Колонка 1,5×70 см; ионит — дауэкс AG-50 W-X8 в H^+-форме, промытый водой; элюаты — вода (до pH элюата 5—6) и соляная кислота (линейное градиентное элюирование, 0—4 М в 2 л); скорость потока 0,7 мл/мин; проба — 120 мл концентрата; объем отбираемых фракций 10 мл (из каждой третьей фракции отбирали аликвотную часть объемом 50 мкл для ауксинографического теста — стимуляция роста *E. aerogenes* PD1, фракции, соответствующие активным хроматографическим зонам, соединяли).

Выделены предшественники: *а* — 2-метил-4-амино-5-оксиметилпиримидин, *б* — 2-метил-4-амино-5-формилпиримидин, *в* — 2-метил-4-амино-5-аминометилпиримидин, *г* — 2-метил-4-амино-5-метоксиметилпиримидин.

ций, обеспечивающих биосинтез пиримидиновой части молекулы тиамина:



5.10.7. ОСНОВАНИЯ, НУКЛЕОЗИДЫ, НУКЛЕОТИДЫ И НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Для разделения компонентов нуклеиновых кислот (т. е. оснований, нуклеозидов и нуклеотидов, а также самих нуклеиновых кислот) ионообменная хроматография применяется в весьма неодинаковой степени. Так, например, ионообменная хроматография — все еще типичный метод разделения нуклеотидов, однако для разделения оснований ее почти не применяют, отдавая предпочтение тонкослойной или бумажной хроматографии. При разделении нуклеиновых кислот ионитам также предпочитают другие сорбенты, в частности оксиапатит, диатомитовые земли, покрытые слоем метилальбумина.

Для разделения этих веществ используются преимущественно аниониты, поскольку как нуклеотиды, так и нуклеиновые кислоты содержат остатки сильной фосфорной кислоты. Для такого разделения пригодны многие готовые иониты, но большинство исследователей пользуется лишь немногими из них. Это прежде всего аниониты на основе полистирола (дауэкс 1 и 2), модифицированная целлюлоза (DEAE-целлюлоза) и иониты типа сефадекс (DEAE-сефадекс).

Ионообменные смолы очень удобны для разделения сложных смесей мононуклеотидов и низших олигонуклеотидов. На $HCOO^-$-форме этих ионитов при элюировании муравьиной кислотой или раствором формиата аммония удается осуществить очень четкое препаративное разделение компонентов смеси. Кроме крутизны градиента, которую легко регулировать, для хорошего разделения требуется выполнение еще ряда условий. Во-первых, отношение высоты колонки к диаметру должно быть примерно равно 10. Во-вторых, важно, чтобы скорость потока элюента не превышала 0,6 мл·см$^{-2}$·мин$^{-1}$. Еще одно очевидное требование — исключение из подаваемого в колонку раствора нежелательных анионов (трихлоруксусной кислоты, или — после экстракции хлорной кислотой — иона ClO_4^-) с тем, чтобы не снизилась емкость колонки, а следовательно, и ее эффективность. Если элюирование ведут муравьиной кислотой, то удалять ее после хроматографического разделения следует выпариванием в мягких условиях (например, в роторном испарителе). Экспериментатору следует помнить о том, что в процессе выпаривания происходит концентрирование в образце муравьиной кислоты, поэтому выпаривание необходимо вести при пониженной температуре. Формиат аммония можно удалить возгонкой при слегка повышенной температуре (до 40 °C) под вакуумом (масляный насос). Нуклеотиды можно адсорбировать из соединенных фракций на активном угле, масса которого в 5—10 раз должна превышать массу нуклеотида. После

промывки угля водой нуклеотиды десорбируют 25%-ным водным этанолом, содержащим 0,5% аммиака. При разделении на анионитах олигонуклеотидов молекулярной массы выше 500 нужно помнить о том, что степень сшивки матрицы анионита должна быть типа X2 или самое большее X4. В качестве примера следует упомянуть фракционирование смеси, содержащей экзотоксин из *Bacillis thuringiensis* (нуклеотидный аналог с молекулярной массой около 750) [175] (рис. 5.38). Можно привести и пример тонкого разделения на том же ионите пробы

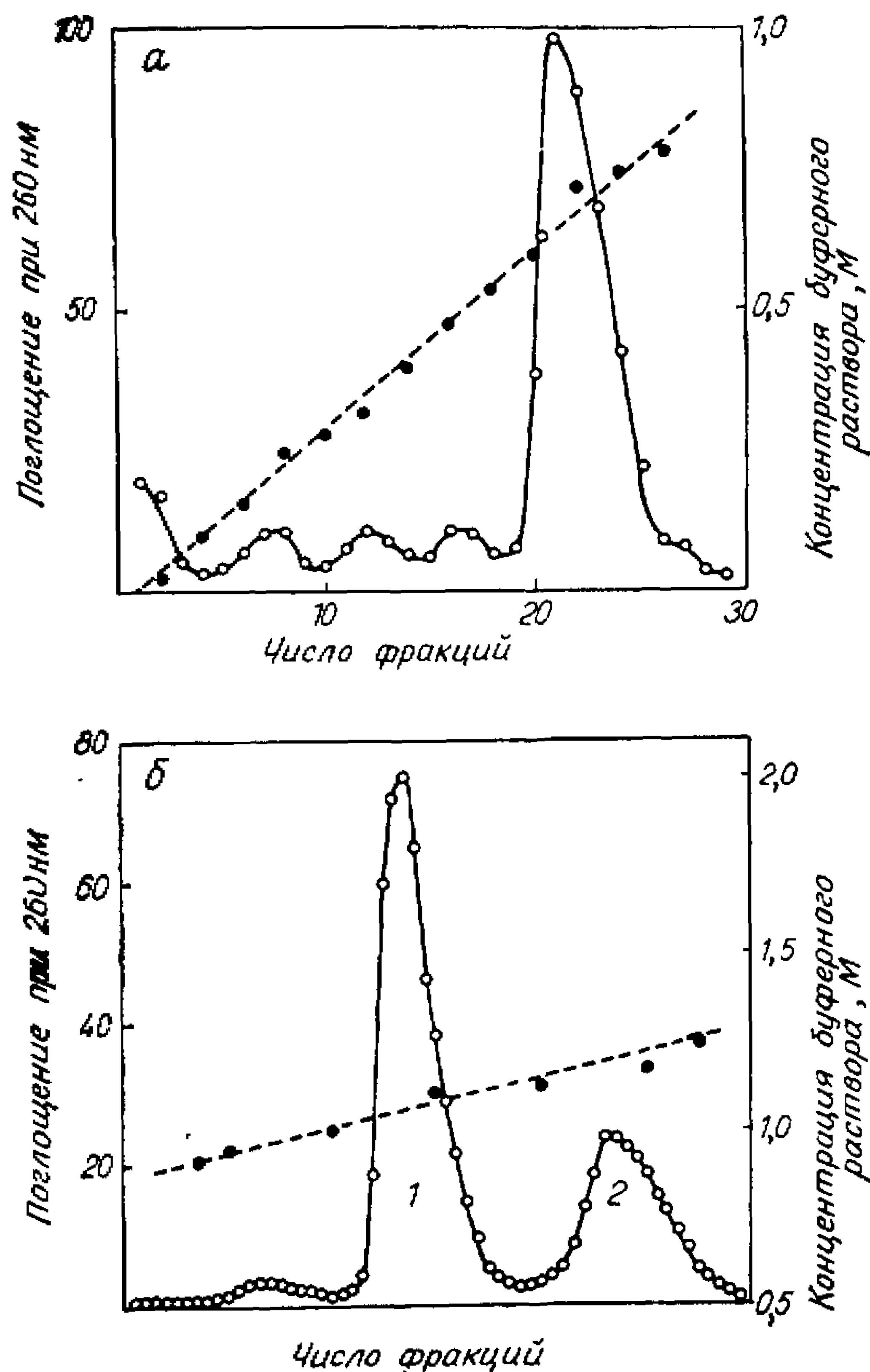


Рис. 5.38. Препаративное хроматографирование (*а*) и повторное хроматографирование (*б*) экзотоксина из *Bacillus thuringiensis* на сильноосновном анионите [175].

а. Колонка 5,7×25 см; ионит — дауэкс 1-X2 в $HCOO^-$-форме; линейное градиентное элюирование формиатом аммония 0—1,3 М; скорость потока 15 мл/мин; проба — 8 г предварительно очищенного токсина в растворе, приведенном к pH 8,5 путем добавления аммиака; объем отбираемых фракций 500 мл; суммарный объем элюата 20 л. *б*. Колонка 1,2×80 см; ионит — дауэкс 1-X2 в $HCOO^-$-форме; линейное градиентное элюирование 700 мл 0,05 М и 700 мл 1,5 М (pH 6) растворов формиата аммония; скорость потока 0,7 мл/мин; объем отбираемых фракций 10 мл.

Выделены: *1* — экзотоксин, *2* — лактон экзотоксина. Штриховая линия — ход градиента.

смеси, содержащей дефосфорилированный экзотоксин и два его лактона [175] (рис. 5.39).

На модифицированной целлюлозе разделение идет несколько хуже, чем на ионообменных смолах; в принципе в этом случае разделение происходит по числу зарядов в молекуле. Помимо этого, модифицированная целлюлоза заметно отличается от полистирольных анионитов своей низкой емкостью. Для элюирования успешно пользуются бикарбонатом триэтиламмония, который легко удалить из продуктов разделения перегонкой с водой. Бикарбонат триэтиламмония можно приготовить,

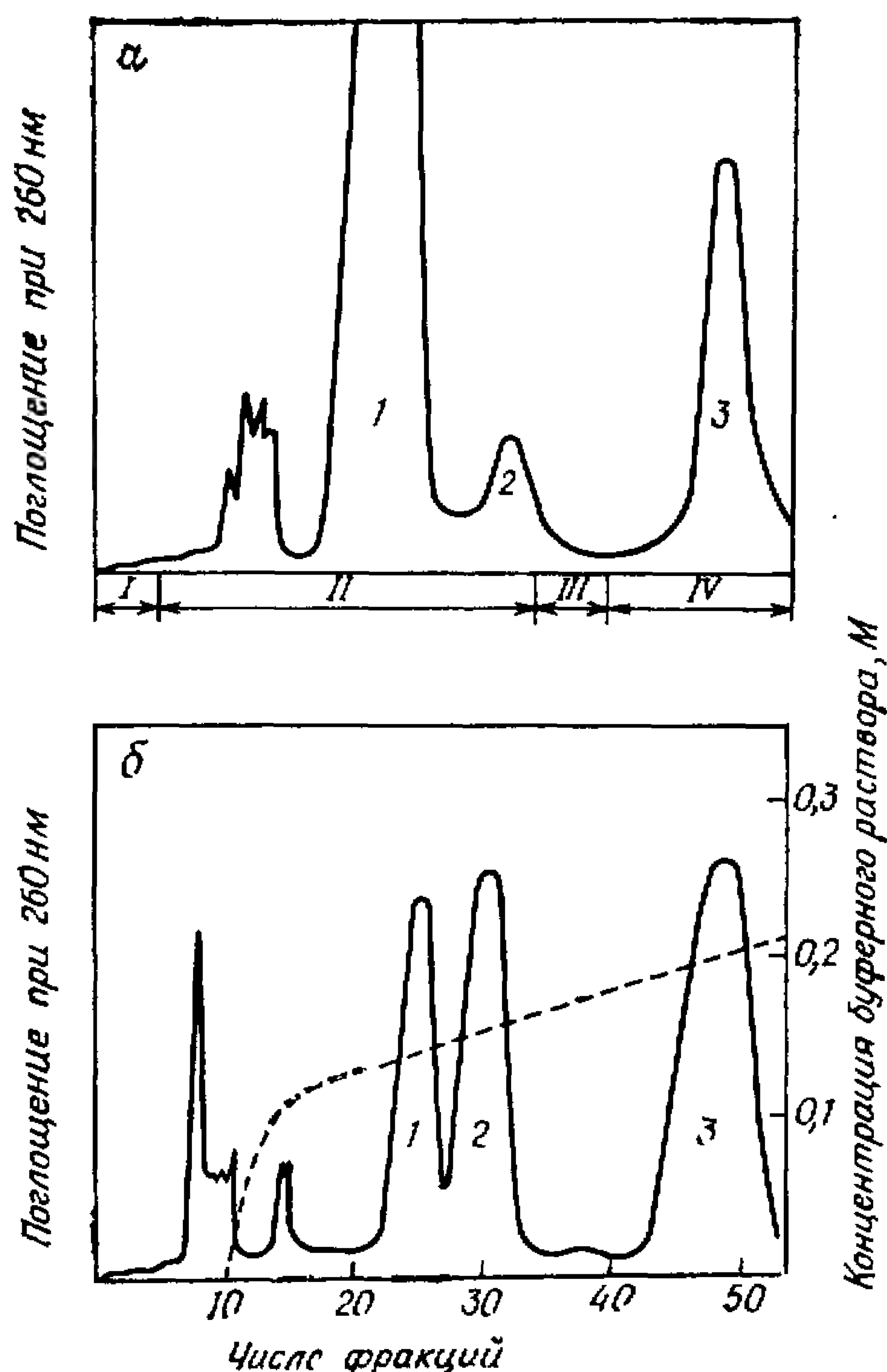


Рис. 5.39. Хроматографирование экзотоксина (ср. рис. 5.38) на сильноосновном анионите после ферментативного дефосфорилирования (*а*) и лактонизации (*б*) [175].

а. Колонка 2,7×26 см; ионит — дауэкс 1-Х2; элюаты — вода (I), муравьиная кислота; линейное градиентное элюирование 700 мл 0,12 *М* и 700 мл 0,29 *М* кислоты (II), вода (III) и 1,3 М раствор формиата аммония, pH 6 (IV); скорость потока 35 мл/мин; проба — 550 мг материала.

Выделены: *1* — дефосфорилированный экзотоксин, *2* — его лактон А, *3* — непрореагировавший экзотоксин.

б. Колонка 0,86×31 см; ионит — дауэкс 1-Х2; элюент — вода (вплоть до фракции *10*) и муравьиная кислота (линейное градиентное элюирование 150 мл 0,1 *М* и 150 мл 0,35 *М* кислоты); проба — 10 мг материала; объем отбираемых фракций 2,6 мл при 10-минутном интервале.

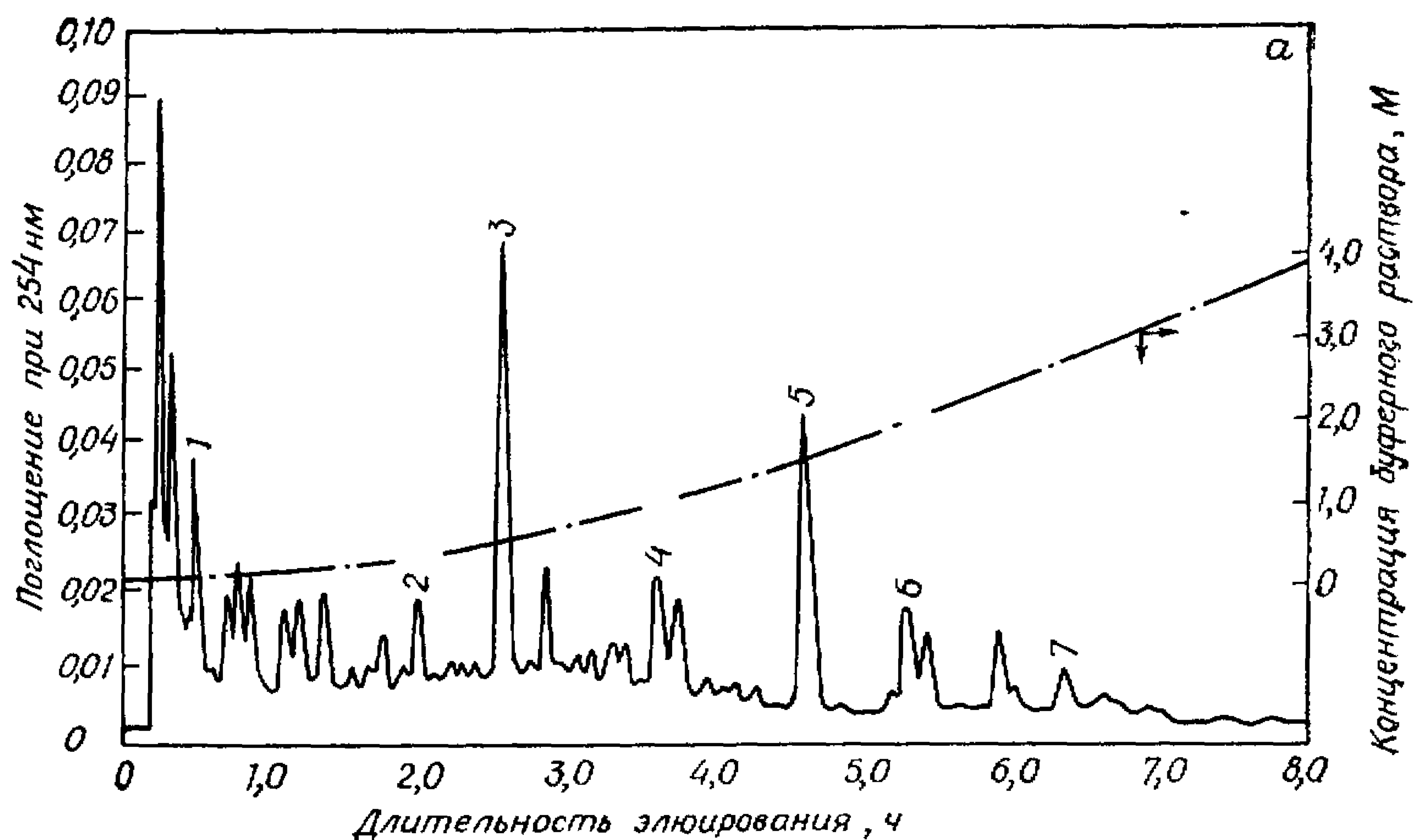
Выделены: *1* — дефосфорилированный экзотоксин, *2* — его лактон Б, *3* — его лактон А.

добавляя по каплям заранее вычисленное количество триэтиламина в ледяную воду, в которую одновременно вводят диоксид углерода. Полученный раствор должен иметь pH 7,8. Концентрацию бикарбоната триэтиламмония в элюате можно измерить рефрактометрически. Для разделения компонентов, различающихся положением *цис*-диольной группировки в сахарной части молекулы, успешно применяли триэтиламмоний-борат [78]. Этот элюент также можно удалить выпариванием, но с метанолом.

В процессе разделения сложных смесей нужно подавлять все взаимодействия молекул с тем, чтобы могло проявиться только различие молекул по числу зарядов. Разделение при этом ведут в среде 7М мочевины. Примером может служить разделение на DEAE-целлюлозе реакционной смеси, содержащей нуклеозиды, нуклеотиды и динуклеозидфосфат, полученной в процессе синтеза UpU (урилуридина) [77]. Смесь (13 ммолей, т. е. около 4 г) образовавшегося UpU, а также 3′UMP (уридинмонофосфата) и уридина слегка подщелачивают (до pH ~8,0) и вводят в колонку 4×80 см, заполненную DEAE-целлюлозой (Cellex D, Calbiochem) в HCO_2-форме. Элюирование ведут бикарбонатом триэтиламмония с линейным градиентом концентрации (от 0 до 0,2М) при скорости потока 3 мл/мин. Полный объем элюата составляет 4 л. Компоненты смеси элюируются из колонки в следующем порядке: уридин, UpU, 3′UMP.

Последнее время иониты довольно часто применяют в высокоэффективной жидкостной хроматографии высокого давления для аналитического разделения производных пуринов, пиримидинов и других соединений, входящих в состав физиологических жидкостей и поглощающих в УФ-области. Для быстрого (в пределах нескольких минут) анализа синтетических смесей этого типа применялись поверхностно-пористые иониты (см. монографию Киркленда [97], а также Дейла и сотр. [40а]). Однако низкая емкость этих ионитов мешает их практическому использованию в анализах физиологических жидкостей. Скотт и Ли [174] сконструировали анализатор, в котором они соединили короткую колонку, заполненную ионитом классического типа, с более длинной колонкой, заполненной поверхностно-пористым ионитом. Первая колонка отличается относительно высокой емкостью, хотя и не обеспечивает идеального разделения, а вторая колонка обеспечивает быстрое и тонкое фракционирование. На этой установке авторы [174] успешно анализировали мочу (рис. 5.40).

Разделение нуклеиновой кислоты и нуклеопротеидов ведут на замещенной целлюлозе с низкой емкостью (0,4—0,6 мэкв./г) с тем, чтобы не происходило сильного связывания



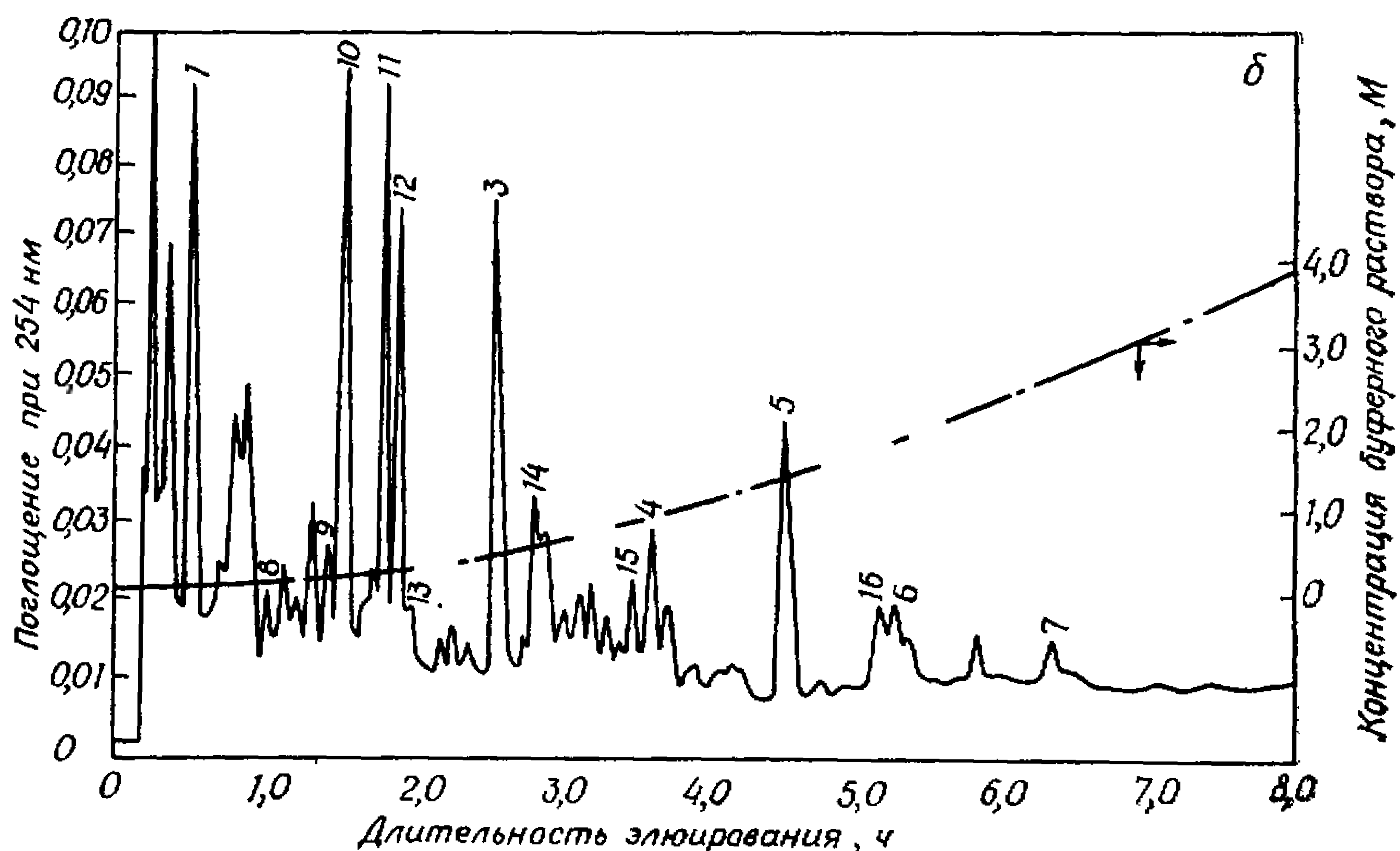


Рис. 5.40. Разделение компонентов мочи, поглощающих в УФ-области спектра, методом жидкостной хроматографии высокого давления с использованием системы из двух последовательно соединенных колонок [174].

Первая колонка 50×0,22 см, заполненная микропористым анионитом аминекс А-27 с частицами размером 12—17 мкм (Bio-Rad Lab.); вторая колонка 150×0,22 см, заполненная поверхностно-пористым анионитом пеллионекс AS (Reeve Angel) с частицами размером 45 мкм; элюент — ацетатный буферный раствор, pH 4,4; градиентное элюирование 0,015 *М* — 6 *М* раствором; рабочее давление до 266 атм; скорость потока 12,0 мл/ч; температура повышалась от ~20 до 60 °С в первой колонке и до 40 °С во второй колонке; проба — по 40 мкл мочи здорового пациента (*а*) и пациента, больного раком, после проведения аллопуриновой терапии (*б*) (о заболевании раком свидетельствует повышенное выделение 1-метилинозина, 1-метил- и N(2)-диметилгуанозина).

Выделены: *1* — псевдоуридин, *2* — метилксантин, *3* — мочевая кислота, *4* — 2-фуроилглицин, *5* — гиппуровая кислота, *6* — 4-оксибензоилглицин, *7* — ваниллиновая кислота, *8* — 1-метилинозин, *9* — 1-метилгуанозин, *10* — N(2)-диметилгуанозин, *11* — аллопуринол, *12* — оксипуринол, *13* — 1-метилксантин, *14* — оротидин, *15* — оротиновая кислота, *16* — 3-метокси-4-оксифенилуксусная кислота.

Таблица 5.18

Список ряда работ, посвященных хроматографии нуклеиновых кислот и их фрагментов

Тема работы	Литература
Хроматография нуклеиновых кислот на кизельгуре	
со слоем основных полиаминокислот	86
со слоем полинуклеотидов	91
со слоем метилированного альбумина	3
Хроматография комплекса РНК-ДНК на оксиапатите	179
Хроматография вирусной РНК на бензоилированной DEAE-целлюлозе	199
Хроматографирование ДНК на сульфированном катионите в Al^{3+}-форме	102
Обращенно-фазная хроматография tРНК	93а, 108б
Лигандообменная хроматография нуклеотидов, нуклеозидов и оснований нуклеиновых кислот	63
Разделение нуклеозидов и нуклеотидов на катионитах	80, 92
Автоматические и скоростные анализы азотсодержащих фрагментов нуклеиновых кислот	131, 161, 215, 218, 232

анализируемых соединений с ионитом. В этой области разработано много отдельных методик специально для конкретных анализов. Примерами могут служить разделение транспортных рибонуклеиновых кислот на бензоилированной DEAE-целлюлозе [61] и разделение полной рибонуклеиновой кислоты и рибосом на DEAE-целлюлозе [140]. Недавно был разработан специальный метод фракционирования нуклеиновых кислот, в частности транспортных, — обращенно-фазная хроматография. В соответствующей хроматографической системе пленка гидрофобной органической жидкой фазы нанесена на инертный носитель. Эта фаза содержит соли оснований четвертичного аммония с длинными алифатическими цепями, например триалкилметиламмонийбромид, в качестве функциональных групп и потому проявляет свойства анионита. Подвижной фазой служит раствор соли, способный селективно экстрагировать удерживаемые в колонке отдельные нуклеиновые кислоты в соответствии с их концентрацией. Этот метод подробно рассматривается в работах [93а, 108б]. Несколько других примеров из области хроматографии нуклеиновых кислот приведены в табл. 5.18. Полный перечень ссылок на работы последних лет можно найти в библиографиях [40, 41].

ЛИТЕРАТУРА

1. *Abe M.*, Bull. Chem. Soc. Japan, **42**, 2683 (1969).
2. *Adams B. A., Holmes E. L.*, J. Soc. Chem. Ind., **54**, 1T (1935).
3. *Altmann H., Dolejs I., Fetter F.*, Anal. Biochem., **21**, 477 (1967).
4. *Amphlett C. B.*, Inorganic Ion Exchangers, Elsevier Amsterdam (1964).
5. Ion Exchange and Membranes, **1**, No. 2, p. 115 (1972); **1**, No. 3, p. 171 (1973); **1**, No. 4, p. 235 (1974).
6. *Aranyi P., Boross L.*, J. Chromatog., **89**, 239 (1974).
6a. *Armitage G. M., Lyle S. J.*, Talanta, **20**, 315 (1973).
7. *Atkin G. E., Ferdinand W.*, Anal. Biochem., **38**, 313 (1970).
8. *Ayres J. T., Mann C. K.*, Anal. Chem., **38**, 861 (1966).
9. *Baily J. L.*, Techniques in Protein Chemistry, 2nd Ed., Elsevier, Amsterdam (1967).
10. *Beck C., Tappel A. L.*, Anal. Biochem., **21**, 208 (1967).
11. *Becker R. R.*, Methods Enzymol., **11**, 108 (1967).
12. *Bennett D. J., Creaser E. H.*, Anal. Biochem., **37**, 191 (1970).
13. *Benson J. V., Jr.*, Anal. Biochem., **50**, 477 (1972).
14. *Benson J. V., Jr., Gordon M. J., Patterson J. A.*, Anal. Biochem., **18**, 228 (1967).
15. *Benson J. V., Jr., Patterson J. A.*, Anal. Biochem., **13**, 265 (1965).
16. *Benson J. R.*, American Laboratory, 53 (1972).
17. *Berquist P. L., Baguley B., Ralph R. K.*, Methods Enzymol., **12**, 660 (1967).
18. *Blackburn S.*, Amino Acid Determination; Methods and Techniques, Dekker, New York (1968).
19. *Bobleter O., Dingler G., Saban C.*, Mikrochim. Acta, 310 (1971).
20. *Bock R. M., Cherayil J. D.*, Methods Enzymol., **12**, 638 (1967).
21. *Brajtler K., Janowski A., Jachimowicz E.*, Chem. Anal. (Warsaw), **15**, 657 (1970).
22. *Breyer A. C., Rieman W.*, III, Anal. Chem. Acta, **18**, 204 (1958).
23. *Buist N. R., O'Brien D.*, J. Chromatog., **29**, 398 (1967).
24. *Buss D. R., Vermuelen T.*, Ind. Eng. Chem., **60**, 12 (1968).
25. *Calmon C., Kressman T. R.*, Ion Exchangers in Organic and Biochemistry, Interscience, New York, 1957, pp. 116—129.
26. *Cassidy H. G., Kun K. A.*, Oxidation-Reduction Polymers, Interscience, New York, 1965.
27. *Cassidy J. E., Streuli C. A.*, Anal. Chim. Acta, **31**, 86 (1964).
28. *Catravas G. N.*, Anal. Chem., **36**, 1146 (1964).
29. *Chajet L., Miller T. W., Coegelman R. T., Kempf A. J., Wolf F.*, J. Antibiotics, **23**, 336 (1970).
30. *Christianson D. D., Wall J. S., Dimler R. J., Senti F. C.*, Anal. Chem., **32**, 874 (1960).
31. *Churacek J., Jandera P.*, Chem. Listy, **64**, 756 (1970).
32. *Colowock S. P., Kaplan N. O.* (Eds.), Methods in Enzymology, Vol. XII, Nucleic Acids, Part A, Grossman L., Moldave K. (Eds.), Academic Press, New York (1967).
33. *Cuatrecasas P., Fusch S., Anfinsen C. G.*, J. Biol. Chem., **242**, 1541 (1967).
34. *Дабагов Н. С., Баландин А. А.*, Изв. АН СССР, сер. хим., **1966**, 1308, 1315.
35. *Dautrevaux M.*, Pharm. Biol., **5**, 501 (1968).
36. *DeGeiso R. C., Rieman W., Lindenbaum S.*, Anal. Chem., **26**, 1840 (1954).
37. *Desnuelle P.*, Methods Enzymol., **11**, 169 (1967).
38. *Deuel H., Hostettler R.*, Experimentia, **6**, 445 (1950).
39. *Devenyi T.*, Acta Biochim. Biophys., **3**, 429 (1968).
40. *Deyl Z., Kopecky J.* (Eds.), Bibliography of Column Chromatography 1971—1973 and Survey of Applications, Elsevier, Amsterdam (1976).

40a. Жидкостная колоночная хроматография. Пер. с англ./Под ред. З. Дейла, К. Мацека, Я. Янака. — М.: Мир, 1978.
41. *Deyl Z., Rosmus J., Juřicová M., Kopecký J.* (Eds.), Liquid Column Chromatography, Elsevier, Amsterdam (1975).
42. *Diorio A. F., Lewin L. M.*, J. Biol. Chem., **243**, 4006 (1968).
43. *Dorfner K.*, Ionenaustausch-Chromatographie, Akademie-Verlag, Berlin (1963).
44. *Dorfner K.*, Ionenaustauscher, p. 36, Walter de Gruyter, Berlin (1964).
45. *Drèze A., Moore S., Bigwood E. J.*, Anal. Chim. Acta, **11**, 554 (1954).
46. *Edmundson A. B.*. Methods Enzymol., **11**, 369 (1967).
47. *Ellis J. P., Jr., Prescott J. M.*, J. Chromatog., **43**, 260 (1969).
48. *Emken E. A., Scholfield C. R., Dutton H. J.*, J. Am. Oil Chemists Soc., **41**, 388 (1964).
49. *Ensign J. C., Wolfe R. S.*, J. Bacteriol., **90**, 395 (1965).
50. *Ensign J. C., Wolfe R. S.*, J. Bacteriol., **91**, 524 (1966).
50a. *Felix A. M., Toome W., De Bernardo S., Weigele M.*, Arch. Biochem. Biophys., **168**, 601 (1975).
51. *Fincham A. G.*, J. Chromatog., **28**, 326 (1967).
52. *Flodin P.*, Dextran Gels and Their Applications in Gel Filtration, Pharmacia Uppsala (1962).
53. *Fotti S. C., Wish L.*, J. Chromatog., **29**, 203 (1967).
54. *Fritz J. S., Garralda B. B.*, Anal. Chem., **34**, 102 (1962).
55. *Fritz J. S., Umbreit G. R.*, Anal. Chim. Acta, **19**, 509 (1968).
56. *Funasaka W., Kojima T., Fujimura K.*, Bunseki Kagaki, **17**, 48 (1968).
56a. *Gaál J., Inczédy J.*, Talanta **23** (1976).
57. *Gans R.*, Jb. Kgl. Preuss. Geol. Landesanstalt, **26**, 179 (1905).
58. *Gaunce A. P., D'Iorio A.*, Anal. Biochem., **37**, 204 (1970).
59. *Gerritsen T., Rehberg M. L., Waisman H. A.*, Anal. Biochem., **11**, 460 (1965).
60. *Ghuysen J. M., Strominger J. L.*, Biochemistry, **2**, 1110 (1963).
61. *Gillam I., Millward S., Blew D., von Tigerstrom M., Wimmer E., Tener G. M.*, Biochemistry, **6**, 3043 (1967).
62. *Goldberg R. D.*, Instrum. News, **18**, 8 (1968). Chem. Abstr., **70**, 84830b (1969).
63. *Goldstein G.*, Anal. Biochem., **20**, 477 (1967).
64. *Goudie A. J., Rieman W.*, Anal. Chem., **24**, 1067 (1952).
65. *Granberg R. R., Walsh K. A., Bradshaw R. E.*, Anal. Biochem., **30**, 454 (1969).
66. *Hamilton P. B.*, Anal. Chem., **30**, 914 (1958).
67. *Hamilton P. B.*, Ann. N. Y. Acad. Sci., **102**, 55 (1962).
68. *Hamilton P. B.*, Methods Enzymol., **11**, 15 (1967).
69. *Heldt H. W., Klingenberg M.*, Methods Enzymol., **10**, 482 (1967).
70. *Helfferich F.*, Natutre, **189**, 1001 (1961).
70a. *Hempel K., Lange H. W., Lustenberger N.*, Inst. Forsch., **2**, 2 (1974).
71. *Hering R.*, Chelatbildence Ionenaustauscher, Akademie-Verlag, Berlin (1967).
72. *Hill R. L., Dalaney R.*, Methods Enzymol., **11**, 339 (1967).
73. *Hirs C. H. W.*, Methods Enzymol., **11**, 27 (1967).
74. *Hirs C. H. W.*, Methods Enzymol., **11**, 386 (1967).
75. *Hirs C. H. W., Moore S., Stein W. H.*, J. Am. Chem. Soc., **76**, 6063 (1964).
76. *Holmquist M. R., Schroeder W. A.*. J. Chromatog., **26**, 465 (1967).
77. *Holý A.*, Collection Czech. Chem. Commun., **35**, 3686 (1970).
78. *Holý A.*, Collection Czech. Chem. Commun., **37**, 4072 (1972).
79. *Hori M.*, Methods Enzymol., **12**, 381 (1967).
80. *Horvath C.*. *Lipsky S. R.*, Anal. Chem., **41**, 1227 (1969).
81. *Horvath C., Preiss B., Lipsky S. R.*, Anal. Chem., **39**, 1422 (1967).
82. *Huemer R. P., Kyung-Dong Lee*, Anal. Biochem., **37**, 149 (1970).

83. *Huff E.*, Anal. Chem., **31**, 1626 (1959).
84. *Iguchi A.*, Bull. Chem. Soc. Japan, 597 (1958).
85. *Jakob F., Park K. C., Ciric J., Rieman W.* III, Talanta, **8**, 431 (1961).
85a. *Jandera P., Churacek J.*, J. Chromatog., **86**, 351 (1973).
86. *Jarvis D., Loeser R., Herrlich P., Röschenthaler R.*, J. Chromatog., **52**, 158 (1970).
87. *Jilek R., Procházka H., Štamberg K.*, пат. ЧССР 158833 (1974).
88. *Jones R. T.*, Methods Biochem. Anal., **18**, 205 (1970).
89. *Jones R. T.*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **29**, 297 (1964).
90. *Jones R. T.*, in «Automation in Analytical Chemistry», Technicon Symposia 1966, Vol. 1, p. 14, Mediad Inc., White Plains, New York (1967).
91. *Julin H.*, Biochim. Biophys. Acta, **217**, 223 (1970).
92. *Junowicz E., Spencer J. H.*, J. Chromatog., **44**, 342 (1969).
93. *Keller R. A.* (Ed.), Separation Techniques in Chemistry and Biochemistry, Dekker, New York (1967).
93a. *Kelmers A. D., Weeren H. O., Weiss J. F., Pearson R. J., Stulberg M. P., Novelli G. D.*, Methods Enzymol., **20**, 9 (1971).
94. *Kemula W., Brozowski S.*, Roczniki Chem., **35**, 711 (1951).
95. *Kennedy W. P., Lee J. C.*, J. Chromatog., **51**, 203 (1970).
96. *Kirkland J. J.*, J. Chromatog. Sci., **8**, 72 (1970).
97. *Kirkland J. J.*, Modern Practice of Liquid Chromatography, Wiley Interscience, New York (1971).
98. *Klement R., Kühn A.*, Z. Abal. Chem., **152**, 146 (1966).
99. *Kluh I.*, Peptides, p. 741 in ref. [40a].
100. *Knight C. S.*, Advan. Chromatog., **4**, 61 (1967).
101. *Korkisch J., Farag A.*, Z. Anal. Chem., **166**, 81 (1959).
102. *Kothari R. M.*, J. Chromatog., **52**, 119 (1970); **53**, 580 (1970).
103. *Kothari R. M.*, Chromatog. Rev., **12**, 127 (1970).
104. *Krampitz G., Albersmeyer W.*, Experientia, **15**, 375 (1959).
105. *Kratochvil V., Povondra P., Šulcek Z.*, Collection Czech. Chem., Commun., **35**, 233 (1970).
106. *Kraus K. A., Moore G. E.*, J. Am. Chem. Soc., **75**, 1460 (1953).
107. *Krejci K., Machleidt W.*, Z. Physiol. Chem., **360**, 981 (1969).
108. *Крищенко Н. П.*, Изв. Моск. с.-х. акад. им. Тимирязева, **219**, 1969.
108a. *Krška, Pelzbauer Z.*, Collection Czech. Chem. Commun., **32**, 4175 (1967).
108b. *Labuda D., Janowicz Z., Šatava I., Farcas G. L.*, Chem. Listy, **69**, 986 (1975).
109. *Latterell J. J., Walton H. F.*, Anal. Chim. Acta, **32**, 101 (1965).
110. *Lindley H., Haylett T.*, J. Chromatog., **32**, 193 (1968).
111. *Linnewah F., Barthelmai W., Wenske G.*, Klin. Wochenschr., **47**, 971 (1969); Chem. Abstr., **71**, 109657m (1969).
111a. *Litenau C., Gocan S.*, Gradient Liquid Chromatography, Horwood, Chichester (1974).
112. *Long C. L., Geiger J. W.*, Anal. Biochem., **29**, 265 (1969).
113. *Lundgren D. P., Loeb N. P.*, Anal. Chem., **33**, 366 (1961).
114. *Maeck W. J., Kussy M. E., Rein J. E.*, Anal. Chem., **35**, 2086 (1963).
115. *Machleidt W., Kerner W., Otto J.*, Z. Anal. Chem., **252**, 151 (1970).
116. *Majumdar S. K., De A. K.*, Anal. Chym. Acta, **25**, 452 (1961).
117. *Manecke G., Gergs P.*, J. Chromatog., **34**, 125 (1968).
118. *Marhol M.*, Chem. Listy, **56**, 728 (1962).
119. *Mikeš O.* Calculation of Gradients, p. 270 in [40a].
120. *Mikeš O.*, Chem. Listy, **54**, 575 (1960).
121. *Mikeš O.*, Enzymes, p. 807 in [40a].
122. *Mikeš O.*, Pousiti menicu ionti v chemii aminokyselin, peptidu, bilkova a nukleovych kyselin in Smid (Ed.), Menice iontu, Jejich vlastosti a pouziti, p. 387, SNTL, Prague (1954).
123. *Mikeš O.*, Practice of Ion Exchange Chromatography, p. 325 in [40a].

123a. *Mikeš O., Štrop P., Zbrožek J., Coupek J.*, J. Chromatog., **119**, 339 (1976).
124. *Miles H. T., Stadtman E. R., Kielley W. W.*, J. Am. Chem. Soc., **76**, 4041 (1954).
125. *Mondono A.*, J. Chromatog., **50**, 260 (1970).
126. *Moore S., Stein W. H.*, J. Biol. Chem., **192**, 663 (1951).
127. *Moore S., Stein W. H.*, J. Biol. Chem., **211**, 893 (1954).
128. *Moore S., Spackman D. H., Stein W. H.*, Anal. Chem., **30**, 1185 (1958).
129. *Monsigny N.*, Bull. Sco. Chim. Biol., **50**, 2188 (1968).
130. *Morris C. J. O. R., Morris P.*, Separation Methods in Biochemistry, Pitman, London (1964).
131. *Murakami F., Rokushika S., Hatano H.*, J. Chromatog., **53**, 584 (1970).
132. *Mutter M.*, Tenside, 5, 138 (1968).
133. *Muzzarelli R. A. A.*, Natural Chelating Polymers, Pergamon, Oxford (1973).
134. *Niederwieser A., Curtius H. Ch.*, J. Chromatog., **51**, 491 (1970).
135. *Nosuhiko Ishibashi, Satsuo Kamato, Masakazu Matsuura, Kogyo Kogaku Zasshi*, **70**, 1036 (1967); Chem. Abstr., **68**, 1647n (1966).
136. *Novotny J.*, FEBS FEBS Letters, 14, 7 (1971).
137. *Novotný J., Franěk F., Šorm F.*, Eur. J. Biochem., **16**, 278 (1970).
138. *Okuyama T., Takio K., Narita K.*, J. Biochem. (Tokyo), **62**, 624 (1967).
139. *Osborn G. H.*, Synthetic Ion Exchangers, pp. 14—39. Chapman & Hall, London (1961).
140. *Otaka E., Osawa S., Oota Y., Ishihama A., Mitsui H.*, Biochim. Biophys. Acta, **55**, 310 (1962).
141. *Pallmann H.*, Bodenkundl. Forschung, **6**, 30 (1938—1939).
142. *Patel D. J., Bafna S. L.*, Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Develop., **4**, 1 (1965).
143. *Patel D. J., Bafna S. L.*, J. Indian Chem. Soc., **42**, 523 (1965).
144. *Pepper K. W.*, J. Appl. Chem., **1**, 124 (1951).
145. *Perham R. N.*, Structural Investigation of Peptides and Proteins, p. 31 in [228].
146. *Peters J. H., Berridge B. J. Jr.* Chromatog. Rev., **12**, 157 (1970).
147. *Peterson E. A.*, Cellulosic Ion Exchangers, Elsevier, Amsterdam (1970).
148. *Peterson E. A., Sober H. A.*, J. Am. Chem. Soc., **78**, 751 (1956).
149. Pharmacia: Sephadex Ion Exchangers: A guide to Ion Exchange Chromatography, Uppsala (1971).
150. *Piez K. A., Morris L.*, Anal. Biochem., **1**, 187 (1960).
150a. *Pogell B. M.*, Methods Enzymol., **9**, 9 (1966).
151. *Pollard F. D., McOmie J. F. W., Nickless G., Hanson P.*, J. Chromatog., **4**, 108 (1960).
152. *Porath J.*, Advances in Separation Methods: γ-Globulins, Proc. Nobel Symp. 3rd Soedergan, Lidingoe (1967).
153. *Porath J.*, Biotechnol. Bioeng. Symp., No. 3, p. 145, Wiley, New York (1972).
154. *Porath J., Fornstedt N.*, Biochim. Biophys. Acta, **229**, 528 (1971).
155. *Porath J., Forstedt N.*, J. Chromatog., **51**, 479 (1970).
156. *Porath J., Fryklund L.*, Nature, **226**, 1169 (1970).
157. *Porath J., Lindner E. B.*, Nature, **191**, 69 (1961).
158. *Prusik Z.*, Proteins, p. 773 in [40a].
159. *Рябчиков Д. И., Осипова В. П.*, Журн. анал. хим., **11**, 278 (1956).
160. *Roos F., Vigneron Cl., Ries-Bourgaux M., Siest G.*, Pharm. Biol., 5, 633 (1968); Chem. Abstr., 71, 98394v (1969).
161. *Sachsenmaier W., Immich H., Grunst J., Scholz R., Bücher T.*, Eur. J. Biochem., **8**, 557 (1969).
162. *Samuelson O.*, Ion Exchange Separation in Analytical Chemistry, Wiley, London, and Almquist and Wiksell, Stockholm (1963).
163. *Samuelson O.*, Z. Anal. Chem., **116**, 328 (1939).
164. *Sargent R. N., Rieman W.* III, Anal. Chim. Acta, **16**, 144 (1957).
165. *Sargent R. N., Rieman W.* III, Anal. Chim. Acta, **17**, 408 (1957).

166. *Sargent R. N., Rieman W.* III, Anal. Chim. Acta, **18**, 197 (1958).
167. *Sargent R. N., Rieman W.* III, J. Org. Chem., **21**, 594 (1956).
168. *Schmidt D. I.* (Ed.), Techniques in Amino Acid Analysis, Technicon Instruments Co. Ltd., Chertsey, England (1965).
169. *Schroeder W. A.*, Methods Enzymol., **11**, 361 (1967).
170. *Schroeder W. A.*, Methods Enzymol., **11**, 351 (1967).
171. *Schroeder W. A., Robertson B.*, Anal. Chem., **37**, 1583 (1965).
172. *Schroeder W. A., Jones R. T., Cormick J., McCalla K.*, Anal. Chem., **34**, 1570 (1962).
173. *Scoggins M. W., Miller J. W.*, Anal. Chem., **40**, 1155 (1968).
174. *Scott Ch., Lee N. E.*, J. Chromatog., **83**, 383 (1973).
175. *Šebesta K., Horská K., Vašková J.*, Collection Czech. Chem. Commun., **34**, 891 (1969).
176. *Ševčik S.*, Chem. Listy, **68**, 232 (1974).
177. *Sherma J., Rieman W. III*, Anal. Chim. Acta, **18**, 214 (1958).
178. *Sherma J. A. Jr., Rieman W. III*, Anal. Chim. Acta, **19**, 134 (1958).
179. *Siebke J. C., Erken T.*, Eur. J. Biochem., **12**, 380 (1970).
180. *Skeggs L. T.*, Am. J. Clin. Path., **28**, 311 (1957).
181. *Skelly N. E.*, Anal. Chem., **33**, 271 (1961).
182. *Skelly N. E., Crummett W. B.*, Anal. Chem., **35**, 1680 (1963).
183. *Small H., Bremer D. N.*, Ind. Eng. Chem. Fundamentals, **3**, 361 (1964).
184. *Sober H. A., Peterson E. A.*, J. Am. Chem. Soc., **76**, 1711 (1954).
184a. *Sarngadharan M. G., Watanabe A., Pogell B. M.*, J. Biol. Chem., **245**, 1926 (1970).
185. *Spackman D. H.*, Methods Enzymol., **11**, 3 (1967).
186. *Spackman D. H., Stein W. H., Moore S.*, Anal. Chem., **30**, 1190 (1958).
187. *Štamberg J.*, Chem. Listy, **62**, 153 (1968).
187a. *Štamberg J., Juračka F.*, Zh. Prikl. Khim., **35**, 2295 (1962).
188. *Štamberg J., Rádl V.*, Ionexy, SNTL, Prague (1962).
189. *Štamberg J., Ševčik S.*, Collection Czech. Chem. Commun., **31**, 1009 (1966).
190. *Štamberg J., Valter V.*, Entfärbungsharze, Akademie-Verlag, Berlin (1970).
191. *Станкевич И. В., Скороходов О. Р.*, Вестн. Акад. наук БССР, сер. хим. наук, **1968**, 118.
192. *Steele R. S., Brendel K., Scheer E., Wheat R. W.*, Anal. Biochem., **34**, 206 (1970).
193. *Stein S., Böhlen P., Stone K., Dairman W., Undenfriend S.*, Arch. Biochem. Biophys., **155**, 203 (1973).
194. *Stein W. H., Moore S.*, J. Biol. Chem., **211**, 915 (1954).
195. *Suda H., Hosono Y., Hosokawa Y., Seto T.*, Kogyo Kagaku Sashi, **73**, 1250 (1970). Chem. Abstr., **73**, 77571b (1970).
196. *Šulcek Z., Rubeška J.*, Collection Czech. Chem. Commun., **34**, 2048 (1969).
197. *Steinbach J., Freiser H.*, Anal. Chem., **24**, 1027 (1952).
198. *Sweet R. C., Rieman W. III, Beukenkampf J.*, Anal. Chem., 24, 952 (1952).
199. *Stern R., Friedman R. M.*, J. Virol., **4**, 356 (1969).
200. *Tager H. S.*, Zand R. Anal. Biochem., **34**, 138 (1970).
201. *Tanase J.*, Tehnica Chromatografica Aminoacizi, Proteine, Acizi Nucleici (Chromatographic Techniques: Amino Acids, Proteins, Nucleic Acids), Ed. Technica, Bucharest (1967).
202. *Taniuchi H., Anfinsen B.*, J. Biol. Chem., **243**, 4778 (1968).
203. *Taniuchi H., Morávek L., Anfinsen C. B.*, J. Biol. Chem., **244**, 4600 (1969).
204. *Tappel A. L., Beck C.*, Automat. Anal. Chem. 3rd Technicon Symposium 1967 (1968) 593; Chem. Abstr. **71**, 228w (1969).
205. *Tener G. M.*, Methods Enzymol., **12**, 398 (1967).
206. *Thompson C. M.*, Lab. Pract., **16**, 968 (1967).
207. *Thompson C. M.*, Whatman Advanced Ion Exchange Celluloses; Laboratory Manual, Balston, Maidstone (1972).
208. *Thompson H. S.*, J. Roy. Agr. Soc. Engl., **11**, 68 (1850).

209. *Tipper D. J., Ghuysen J. M., Strominger J. L.*, Biochemistry, **4**, 468 (1965).
210. *Tipper D. J., Strominger J. L., Ensign J. C.*, Biochemistry, **6**, 906 (1967).
211. *Tiselius A.*, Arkiv. Kemi, 7, 49 (1954).
212. *Tommel D. K. J., Vliegenthart J. F. G., Penders T. J., Arens J. F.*, Biochem. J., **107**, 335 (1968).
213. *Tsuk A. G., Gregor H. P.*, J. Am. Chem. Soc., **87**, 5538 (1965).
214. *Turse R., Rieman W. III*, Anal. Chim. Acta, 24, 202 (1961).
215. *Uziel M., Koh Ch. K., Cohn W. E.*, Anal. Biochem., **25**, 77 (1968).
216. *Вайнтрауб И. А., Шутов А. Д.*, Тр. ин-та химии природн. соед., **7**, 1968. Chem. Abstr., **73**, 21990v (1970).
217. *Van der-Haar F.*, Methods Enzymol., **34**, 163 (1974).
218. *Virkola P.*, J. Chromatogr., **51**, 195 (1970).
219. *Wall R. A.* Anal. Biochem., **35**, 203 (1970).
220. *Walsh K. A., McDonald R. M., Bradshaw R. A.*, Anal. Biochem., 35, 193 (1970).
220a. *Wataru Funasaka, Tsugio Kojima, Kazumi Fujimura*, Bunseki Kagaku, **17**, 48 (1968).
221. *Way J. T.*, J. Roy. Agr. Soc. Engl., **11**, 313 (1850).
222. *Weaver V. C.*, Z. Anal. Chem., **243**, 491 (1968).
223. *Weaver V. C.*, Chromatographia, **2**, 555 (1965).
224. *Weltlesen C. V.*, Anal. Chim. Acta, **22**, 189 (1960).
225. *Wheaton R. M., Bauman W. C.*, Ind. Eng. Chem., **43**, 1088 (1951).
226. *Wheaton R. M., Hatch M. J.*, in «Ion Exchange, A Series of Advances», J. A. Marinski (Ed.), Vol. 1, pp. 191—234 Dekker, New York (1966).
227. *Wolf F. J.*, Separation Methods in Organic Chemistry and Biochemistry, Academic Press, New York (1969).
227a. *Yaku F., Matsumisha Y.*, Nippon Kagaku Zasshi, **87**, 969 (1966); Chem. Abstr., **65**, 19288f (1966).
228. *Young G. T.* (Ed.), Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. 1, The Chemical Society, London (1969).
229. *Zadrazil S.*, Nucleic Acids, p. 859 in ref. [40a].
230. *Zadražil S.*, Low Molecular Weight Constituents of Nucleic Acids, Nucleosides, Nucleotides and Their Analogies, p. 831 in ref. [40a].
231. *Zachariesen H., Breamisch F. E.*, Anal. Chem., **34, 964 (1962)**.
232. *Zenišek Z., Lašťovková J., Varhaníc J.*, Sci. Tools, **16**, 39 (1969).
233. *Zipkin I., Armstrong W. D., Singer L.*, Anal. Chem., **29**, 310 (1957).
234. *Zmrhal Z., Heathcote J. G., Washington R. J.*, Amino Acids., p. 665 in ref. [40a].
235. *Zmrhal Z.*, in *Mikeš O.* (Ed.) Laboratory Handbook of Chromatographic Methods, 1st Ed., p. 271, Van Nostrand, London (1966).

Глава 6. Гель-хроматография

В. ТОМАШЕК

Институт органической химии и биохимии
Чехословацкой Академии наук, Прага

6.1. ВВЕДЕНИЕ

Разделить смесь соединений в соответствии с молекулярными размерами последних можно методами дробного диализа [8], ультрафильтрации и ультрацентрифугирования. Некоторые из этих методов требуют много времени и малопроизводительны, для других необходимо специальное дорогостоящее оборудование. Относительно просто осуществить такое разделение при помощи молекулярых сит [24]. Молекулярными ситами называют определенные типы природных и синтетических цеолитов (алюмосиликатов), кристаллическая структура которых не меняется в процессе их дегидратации. В результате дегидратации в структуре кристаллов образуются микроканалы и микропоры определенных размеров. Через эти поры могут проходить только низкомолекулярные соединения, а для высокомолекулярных соединений они недоступны, таким образом и происходит разделение в соответствии с молекулярными размерами. Среди водорастворимых веществ свойства молекулярных сит наблюдаются у гранулированного крахмала [29, 32].

В полной мере этот эффект начали использовать после 1959 г., когда Порат и Флодин [44] опубликовали работу, посвященную разделению соединений на гелях сшитого декстрана, и описали «быстрый и простой метод фракционирования водорастворимых веществ» (этим утверждением начиналась их статья). Они назвали предложенный метод гель-фильтрацией. В то же время фирма Pharmacia (Упсала, Швеция) наладила выпуск сефадекса — сшитого декстрана. И это, по-видимому, и явилось основной причиной быстрого развития и широкого распространения метода, который вскоре был освоен и начал применяться почти во всех отраслях биохимии. В настоящее время, когда со дня первой публикации прошло более 20 лет,

можно утверждать, что в биохимии и химии полимеров гель-фильтрация — один из основных и наиболее широко применяемых методов разделения.

6.1.1. ПРИНЦИПЫ ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИИ

Итак, гель-хроматография представляет собой простой метод разделения соединений в соответствии с размерами и формой их молекул. Флодин [18] предложил простую модель,

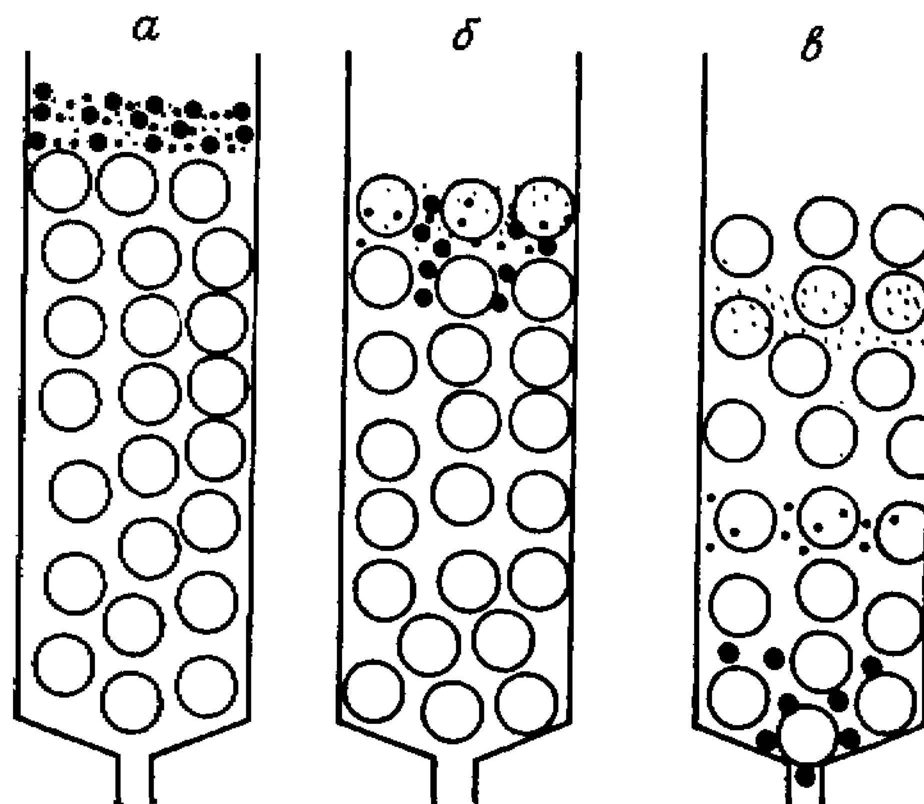


Рис. 6.1. Схема разделения методом гель-хроматографии.

Большие полые кружки — частицы геля; большие точки — молекулы высокомолекулярных соединений; меньшие точки — молекулы соединений с меньшей молекулярной массой; маленькие точки — молекулы низкомолекулярных соединений; *а* — исходное положение; *б* — начальная стадия элюирования; *в* — более поздняя стадия элюирования.

объясняющую принципы гель-хроматографии. Неподвижную фазу образует гель, представляющий собой химически инертную, сшитую, нерастворимую полимерную матрицу, насыщенную жидкостью, обычно водой. Та же жидкость служит подвижной фазой. В полимерной матрице имеются поры, размер которых зависит от типа используемого геля. Анализируемые соединения можно разделить на три группы соответственно их молекулярным размерам: высокомолекулярные соединения, соединения с меньшей молекулярной массой и низкомолекулярные соединения, например соли. Раствор смеси соединений этих трех групп подают на колонку, заполненную гелем, и элюируют чистым растворителем. Большие молекулы не могут проникнуть в поры геля, они проходят по колонке вместе с потоком растворителя, обтекающего частицы геля, т. е. в наружном объеме (см. разд. 6.1.2). Маленькие молекулы могут диффундировать в поры геля, и они равномерно распределяются в жидкой фазе как снаружи, так и внутри геля. Молекулы, на-

ходящиеся внутри геля, т. е. внутри неподвижной фазы, элюируются медленнее всего — при пропускании через слой геля такого объема растворителя, который приблизительно равен объему слоя геля. Молекулы средних размеров лишь частично диффундируют внутрь геля, и концентрация их в геле меньше, чем концентрация маленьких молекул. Поэтому соединения с молекулами среднего размера элюируются позднее высокомолекулярных и раньше низкомолекулярных компонентов. Таким образом, соединения выходят из колонки, заполненной гелем, в порядке, соответствующем убыванию их молекулярных масс (рис. 6.1).

6.1.2. ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ОСНОВНЫЕ ПОНЯТИЯ

Прежде чем перейти к более детальному описанию методики гель-хроматографии, мы рассмотрим терминологию, применяемую в этом виде хроматографии, и объясним, в частности, причины появления тех или иных терминов.

Различные авторы называли этот метод по-разному — в зависимости от того, какие его особенности они хотели подчеркнуть. Порат и Флодин [44] назвали метод гель-фильтрацией, Фазольд и др. [16] — фильтрацией через молекулярные сита. Педерсен [36] называет его эксклюзионной (исключающей) хроматографией, Хьертен и Мосбах [26] — хроматографией через молекулярные сита, Стеере и Аккерс [46] — хроматографией при затрудненной диффузии, а Моор [33] — гель-проникающей хроматографией. В этой книге применяется название гель-хроматография, предложенное в 1964 г. Детерманом [11]. Термин «хроматография» больше соответствует существу метода, чем фильтрация, а сочетание со словом «гель» позволяет одновременно определить характер носителя, на котором совершается хроматографическое разделение. Это наименование имеет более общий характер, чем некоторые упомянутые выше термины, авторы которых старались подчеркнуть преобладающий принцип разделения.

Выпускаемые в продажу материалы для гель-хроматографии можно разделить на три группы: ксерогели, аэрогели и ксерогель-аэрогелевые гибриды.

Ксерогели представляют собой классические гели, образованные линейными макромолекулами, взаимное расположение которых закреплено ковалентными поперечными связями (сшивками) или также водородными связями. Нерастворимая матрица ксерогелей пронизана порами определенных размеров. Типичные представители ксерогелей — гели сефадекс G, биогель P и биобедс S (см. разд. 6.2.2, 6.2.3 и 6.2.6). В качестве растворителя в сочетании со ксерогелями чаще всего употребляют во-

Таблица 6.1

Технические характеристики сефадексов G [38]

Тип сефадекса	Размер сухих частиц[a], мкм	Водоемкость сухого сефадекса, мл H_2O/г	Удельный объем слоя сухого сефадекса, мл/г	Интервал фракционирования молекул, выраженный в молекулярных массах	
				для пептидов и глобулярных белков	для декстранов
G-10	40—120	1,0±0,1	2—3	<700	<700
G-15	40—120	1,5±0,2	2,5—3,5	<1500	<1500
G-25 крупный	100—300	2,5±0,2	4—6	1000—5000	100—5000
G-25 средний	50—150				
G-25 тонкий	20—80				
G-25 сверхтонкий	10—40				
G-50 крупный	100—300	5,0±0,3	9—11	$1500—3\cdot10^4$	$500—10^4$
G-50 средний	50—150				
G-50 тонкий	20—80				
G-50 сверхтонкий	10—40				
G-75	40—120	7,0±0,5	12—15	$3000—7\cdot10^4$	$1000—5\cdot10^4$
G-75 сверхтонкий	10—40				
G-100	40—120	10,0±1,0	15—20	$4000—1,5\cdot10^5$	$1000—10^5$
G-100 сверхтонкий	10—40				
G-150	40—120	15,0±1,5	20—30	$5000—4\cdot10^5$	$1000—1,5\cdot10^5$
G-150 сверхтонкий	10—40				
G-200	40—120	20,0±1,0	30—40	$5000—8\cdot10^5$	$1000—2\cdot10^5$
G-200 сверхтонкий	10—40				

[a] Сефадекс выпускают в виде сухого порошка, состоящего из микроскопических шариков.

Таблица 6.2

Емкость сефадекса LH-20 в различных растворителях [38, 39]

Растворитель	Емкость сухого геля, мл/г	Удельный объем слоя сухого геля, мл/г
Диметилформамид	2,2	4,0—4,5
Вода	2,1	4,0—4,5
Метанол	1,9	4,0—4,5
Этанол	1,8	3,5—4,5
Хлороформ, стабилизованный 1% этанола	1,8	3,5—4,5
Хлороформ	1,6	3,0—3,5
н-Бутанол	1,6	3,0—3,5
Диоксан	1,4	3,0—3,5
Тетрагидрофуран	1,4	3,0—3,5
Ацетон	0,8	1,5
Этилацетат	0,4	0,5—1,0
Толуол	0,2	0,5

ду, в которой эти гели значительно набухают (см. табл. 6.1, 6.2 и 6.3). Под действием некоторых органических растворителей гель опадает.

В отличие от ксерогелей аэрогели имеют инертную твердую матрицу неизменяемой структуры с маленькими каналами и порами определенного размера. В сухом аэрогеле эти поры заполнены воздухом. Перед употреблением аэрогелей воздух из пор вытесняют растворителем. Аэрогели можно применять в сочетании с любым растворителем, так как их матрица не набухает. При замене растворителя новый растворитель вытесняет из пор старый растворитель; на структуру пор и всего геля такая замена не влияет. Типичный представитель аэрогелей — пористое стекло.

Ксерогель-аэрогелевые гибриды обладают структурными особенностями гелей обоих типов. У этих так называемых негомогенных гелей твердая полимерная матрица с большим числом поперечных связей пронизана многочисленными микропорами, образующими, как и в аэрогелях, так называемые макропоры (см. ниже рис. 7.4, гл. 7). Микропористые части структуры способны сольватироваться подобно ксерогелям, но только в небольшой степени из-за наличия большого числа поперечных связей. Набухание в воде или органических растворителях приводит только к небольшим изменениям объема. Поскольку полимерная матрица довольно жесткая, гели этого ти-

Таблица 6.3

Технические характеристики биогеля Р [5]

Марка биогеля	Размеры гидратированных частиц		Водоемкость[а], мл/г	Удельный объем слоя сухого ксерогеля, мл/г	Минимальная скорость потока[б], $мл \cdot см^{-2} \cdot ч^{-1}$,	Максимально допустимое гидростатическое давление, см вод. ст.	Интервал фракционирования и предел исключения[в]
	меш (по стандарту США)	мкм					
Р-2	50—100	149—297	1,5	3	190	100	100—1800
	100—200	74—149			110		
	200—400	37—74			30		
	—400	10—37			—		
Р-4	50—100	149—297	2,4	4,8	170	100	800—4000
	100—200	74—149			95		
	200—400	37—74			30		
	—400	10—37			—		
Р-6	50—100	149—297	3,7	7,4	150	100	1000—6000
	100—200	74—149			75		
	200—400	37—74			30		
	—400	10—37					
Р-10	50—100	149—297	4,5	9,0	150	100	$1500—2 \cdot 10^4$
	100—200	74—149			75		
	200—400	37—74					
	—400	10—37					
Р-30	50—100	149—297	5,7	11,4	110	100	$2500—4 \cdot 10^4$
	100—200	74—149			65		
	—400	10—37			—		

Продолжение табл. 6.3

Марка биогеля	Размеры гидратированных частиц		Водоемкость[а], мл/г	Удельный объем слоя сухого ксерогеля, мл/г	Минимальная скорость потока[б], $мл \cdot см^{-2} \cdot ч^{-1}$	Максимально допустимое гидростатическое давление, см вод. ст.	Интервал фракционирования и предел исключения[в]
	меш (по стандарту США)	мкм					
Р-60	50—100	149—297	7,2	14,4	95	100	$3000—6 \cdot 10^4$
	100—200	74—149			30		
	—400	10—37			—		
Р-100	50—100	149—297	7,5	15,0	65	60	$5000—10^5$
	100—200	74—149			30		
	—400	10—37			—		
Р-150	50—100	149—297	9,2	18,4	45	30	$1,5 \cdot 10^4—1,5 \cdot 10^5$
	100—200	74—149			25		
	—400	10—37			—		
Р-200	50—100	149—297	14,7	29,4	22	20	$3 \cdot 10^4—2 \cdot 10^5$
	100—200	74—149			11		
	—400	10—37			—		
Р-300	50—100	149—297	18,0	36,0	15	15	$6 \cdot 10^4—4 \cdot 10^5$
	100—200	74—149			6		
	—400	10—37					

[а] Приближенные величины.
[б] Скорость потока определена на колонке размером 1,1×13 см при гидростатическом давлении 15 см вод. ст.
[в] Самая большая цифра — предел исключения. Для биогелей Р-2, Р-4, Р-6 определен по пептидам, для всех остальных биогелей — по глобулярным белкам. Для молекул другой геометрической конфигурации предел исключения несколько ниже.

па могут выдерживать высокие давления и не деформироваться в процессе хроматографирования. Большинство таких гелей не опадает, когда изменяется характер растворителя. Типичными представителями этой группы гелей являются сферон и стирагель.

Хроматографическая колонка представляет собой трубку из стекла или другого материала (ее устройство описано в разд. 6.3.1 и гл. 4, 5 и 8), заполненную хроматографическим

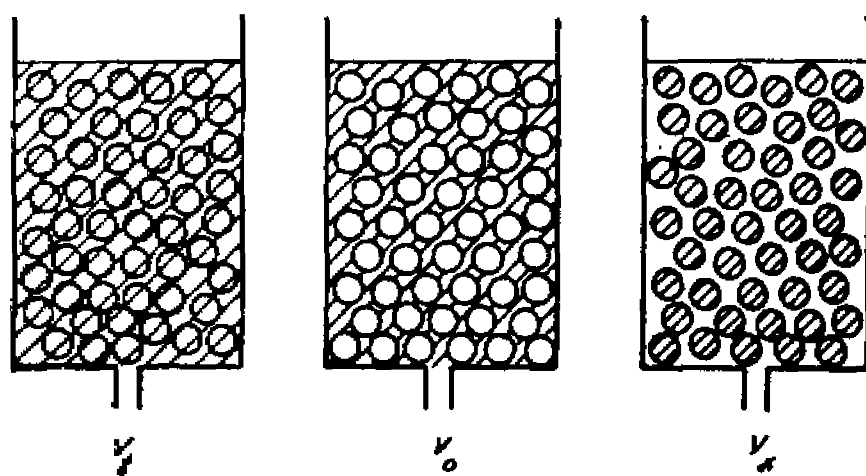


Рис. 6.2. Схематическое изображение общего V и наружного V_0 объемов и объема геля V_x.

слоем, в данном случае цилиндрическим слоем геля. В гель-хроматографии пробу вводят в колонку всегда в виде раствора. Если хроматографическую колонку заполняют суспензией геля в растворителе и гелю затем дают осесть, то заполнение колонки характеризуют окончательными размерами слоя геля — высотой h и диаметром d.

В гель-хроматографии применяют следующие основные обозначения и определения (см. рис. 6.2).

V_t — общий объем хроматографического слоя;

V_0 — наружный объем, называемый также исключенным объемом, свободным объемом, удерживаемым объемом, мертвым объемом; это — объем жидкости (воды), заполняющей пространство между набухшими частицами геля;

V_x — объем набухшего геля в хроматографическом слое;

V_i — внутренний объем — доля объема фазы геля, занятая находящейся в нем жидкостью;

V_h — гидратационный объем — объем воды, прочно связанной с ксерогелем; эта вода не может выполнять функцию растворителя;

V_e — объем элюирования или объем удерживания вещества — объем растворителя, необходимый для переноса вещества через весь хроматографический слой;

V_g — парциальный удельный объем матрицы геля;

m_g — масса матрицы геля в слое;

W_R — водоемкость ксерогеля — способность его удерживать воду;

K_D — константа распределения вещества между гелем и жидкой фазой.

Указанные характеристики связаны между собой следующими соотношениями:

$$V_t=V_0+V_x, \quad (6.1)$$

$$V_x=V_i+K_g, \quad (6.2)$$

$$V_t=V_0+V_i+V_g, \quad (6.3)$$

$$V_i=V_x-m_gV_g, \quad (6.4)$$

$$V_i=m_gW_R. \quad (6.5)$$

Общий объем слоя V_t можно рассчитать по формуле объема цилиндра, если известны внутренний диаметр и длина колонки. Поскольку объем пропорционален квадрату диаметра, то последний необходимо определить возможно точнее. Более точно определить V_t можно, заполнив колонку водой и тщательно измерив объем воды. Свободный объем V_0 можно определить экспериментально, хроматографируя высокомолекулярное соединение, которое не может проникнуть внутрь частиц геля, и измеряя его объем элюирования. Не удерживаемые гелем соединения обычно элюируются в виде четких зон. Для такого определения удобен, например, синий декстран 2000 (мол. масса около $2\cdot10^6$), выпускаемый фирмой Pharmacia Fine Chemicals (Упсала). Величину V_i рассчитывают по уравнению (6.4) или (6.5), а величину W_R обычно указывает фирма, выпускающая гель (см. табл. 6.1, 6.2 и 6.3).

6.2. ГЕЛИ ДЛЯ ХРОМАТОГРАФИИ

6.2.1. ТРЕБОВАНИЯ, ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫЕ К ГЕЛЯМ

Применяемые в хроматографии гели, помимо их хроматографических свойств, должны удовлетворять еще некоторым общим требованиям. Матрица геля должна быть химически инертной, т. е. в ходе хроматографирования не должно происходить химическое связывание разделяемых соединений. Поскольку гель-хроматографию применяют для разделения нестойких веществ, например белков, ферментов, нуклеиновых

кислот и т. п., то при контакте с матрицей геля не должна происходить их денатурация. При гель-хроматографии некоторых типов соединений, в частности ароматических и гетероциклических, наблюдается слабое обратимое взаимодействие с поверхностью геля (адсорбция) [21]. В большинстве случаев оно не мешает разделению; более того, этот эффект можно даже использовать для улучшения разделения. Очень важное значение имеет также химическая устойчивость геля: он не должен претерпевать химические превращения в широком интервале величин pH и температуры, не должен разлагаться в процессе хроматографирования, иначе продукты разложения могут выщелачиваться и загрязнять разделяемые соединения. Гель должен быть химически нейтральным, т. е. он не должен содержать ионизируемых групп или содержание их должно быть минимальным, чтобы ионный обмен был исключен. В противном случае уменьшается выход соединений, которые могут диссоциировать, и наблюдается искажение кривых элюирования.

Имеющиеся в продаже гели (сефадекс G, биогель P) содержат небольшие количества свободных карбоксильных групп. Диссоциацию этих групп и обусловленный ими ионный обмен можно подавить, проводя хроматографирование элюентом с добавкой электролита, повышающего его ионную силу μ до 0,02 и выше.

В распоряжении экспериментаторов, использующих гель-хроматографию, должно находиться большое число видов гелей с одинаковыми общими химическими характеристиками, чтобы можно было соответствующим образом подобрать интервал фракционирования. У большинства ксерогелей интервал фракционирования определяется степенью сшивки, от которой зависит способность геля к набуханию. Чем ниже степень сшивки, тем сильнее гель может набухать и тем доступнее он становится для больших молекул. Выпускаемые в настоящее время гели допускают широкий выбор интервалов фракционирования (для молекулярных масс от 10^3 до 10^7). Очень важное свойство гелей — их механическая прочность: заполняющий колонку слой геля не должен деформироваться при пропускании через него потока элюента. Деформация частиц геля приводит к увеличению гидравлического сопротивления хроматографического слоя, сопровождающемуся уменьшением скорости течения, а иногда даже деформацией слоя в целом, вследствие которой он становится совершенно непроницаемым для растворителя. Обычно более сильно набухающие гели характеризуются меньшей механической стойкостью, и поэтому при работе с ними обычно надо строго придерживаться определенных правил (см. разд. 6.3).

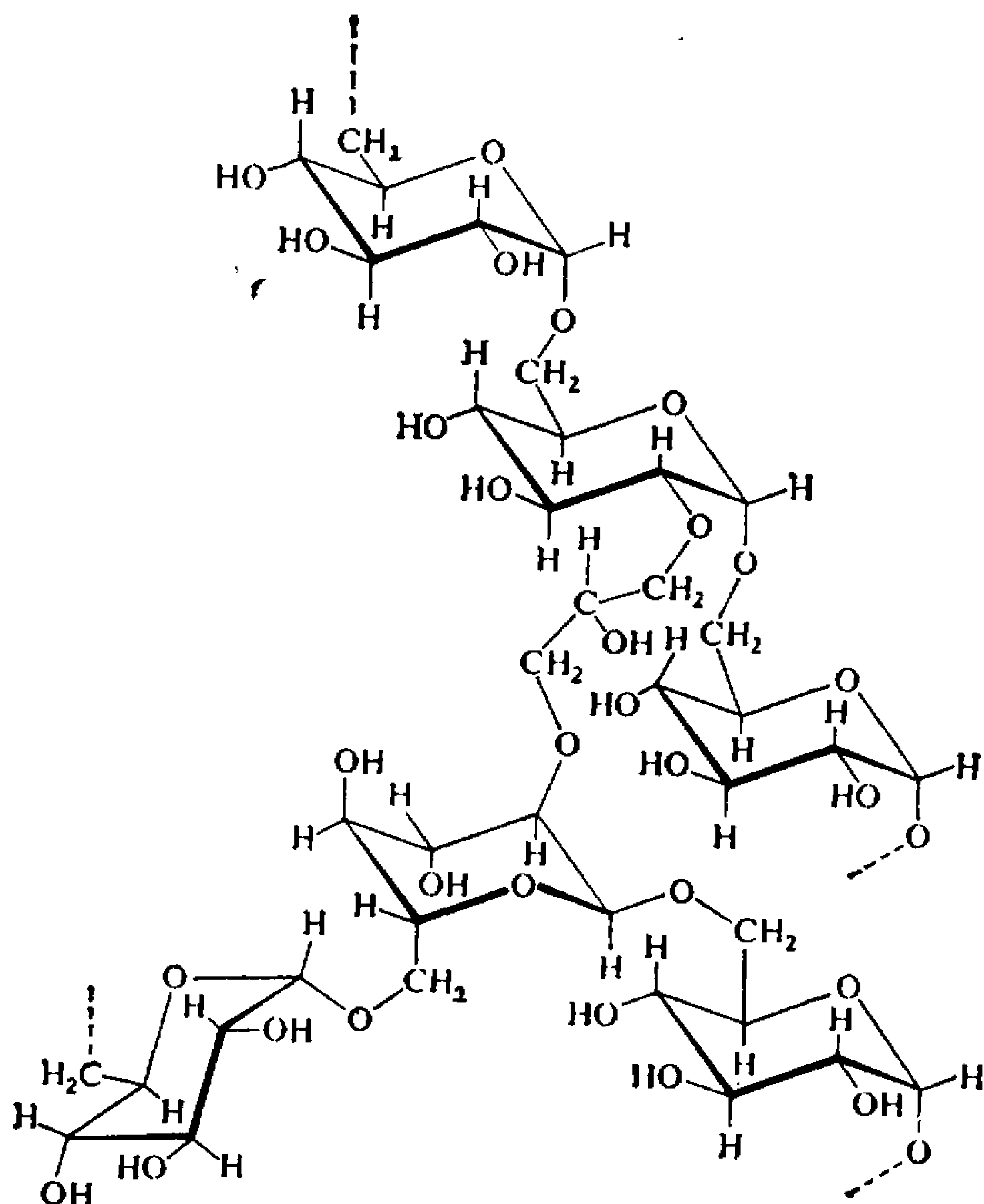
Другое важное свойство, оказывающее влияние на хроматографические качества геля, — это размеры частиц и их однородность. Гели с маленькими частицами позволяют получить отличное разрешение. В больших частицах диффузия идет медленнее, это приводит к расширению зон и, следовательно, к ухудшению разрешения. Однако при использовании гелей с большими частицами скорость потока элюента может быть достаточно высокой, тогда как скорость потока элюента через тонкодисперсные гели остается довольно низкой.

Таким образом, применение больших частиц приводит к ограничению разрешения, а применение малых частиц — к ограничению скорости течения. Поскольку ни один из материалов не является строго однородным по величине частиц, естественно требовать, чтобы распределение их по размерам было возможно более узким. Подобно твердым фазам для других типов колоночной хроматографии, гели для хроматографии приготовляют или в виде частиц произвольной формы (посредством размола более крупных частиц), или в виде сферических частиц, которые более удобны (бóльшая механическая прочность частиц из-за меньшего истирания их, бóльшая проницаемость колонок вследствие меньшего гидравлического сопротивления) для всех видов хроматографии вообще и для гель-хроматографии в частности.

6.2.2. ДЕКСТРАНОВЫЕ ГЕЛИ

СЕФАДЕКС G

Декстрановые гели для гель-хроматографии производит и выпускает в продажу под названием «сефадексы» фирма Pharmacia Fine Chemicals AB (Упсала, Швеция). Декстран представляет собой полисахарид, образованный глюкозными остатками. Его получают ферментацией сахарозы микроорганизмами *Leuconostoc mesenteroides*. Глюкозные остатки соединены в макромолекуле декстрана α-1,6-гликозидными связями. Исходный декстран характеризуется широким распределением по молекулярным массам (10^7—$3 \cdot 10^8$). После очистки, частичного гидролиза и фракционирования осаждением этанолом получают продукт, из которого изготавливают собственно сефадекс. С этой целью щелочной водный раствор декстрана обрабатывают эпихлоргидрином в эмульсионной среде. В результате этой реакции декстрановые молекулярные цепи сшиваются глицерильными мостиками. Образуется нерастворимая трехмерная сильно гидрофильная структура, способная впитывать воду; степень набухания ее зависит от числа поперечных связей.



В зависимости от степени сшивки, определяющей способность геля к набуханию, выпускается восемь видов сефадекса G, основные характеристики которых перечислены в табл. 6.1. Эти восемь видов сефадекса маркируются числами, которые ставятся после буквы G (от сефадекса G-10 до сефадекса G-200), и им соответствует 10-кратный интервал изменения величины водоемкости W_R.

Сефадексы ряда G набухают также в диметилсульфоксиде, формамиде и гликоле, а сефадексы G-10 и G-15 — также в диметилформамиде. Однако их емкость по отношению к органическому растворителю отличается от водоемкости. Эти материалы устойчивы в воде, растворах солей, органических растворителях, щелочных и слабокислых средах. В сильнокислой среде, особенно при повышенной температуре, гидролизуются гликозидные связи. Сефадекс можно безбоязненно выдерживать 1—2 ч в 0,1 н. соляной кислоте, а в 0,02 н. соляной кислоте он может находиться до 6 месяцев [9].

Свойства сефадекса G-25 не меняются после 2-месячного выдерживания в 0,25 н. растворе гидроксида натрия при 60 °C. Смоченный нейтральным раствором сефадекс можно нагревать до 110 °C и, следовательно, его можно стерилизовать в авто-

клаве. Сухой сефадекс можно нагревать до 120 °С; при дальнейшем повышении температуры происходит его карамелизация. Сефадекс нельзя подвергать длительному воздействию окислителей, поскольку они разрушают матрицу геля, в результате чего образуются свободные карбоксильные группы.

СЕФАДЕКС LH-20

Сефадекс LH-20 предназначен для разделения нерастворимых в воде соединений. Буквы LH означают, что матрица этого геля набухает как в липофильных (lipophilic), так и гидрофильных (hydrophilic) растворителях. Сефадекс LH-20 представляет собой оксипропильное производное сефадекса G-25. Способность его к набуханию в различных растворителях указана в табл. 6.2. Хроматографические свойства этого материала в разных растворителях различны. Нижний предел интервала фракционирования соответствует молекулярной массе около 100, а верхний — от 2000 до 10 000 в зависимости от растворителя.

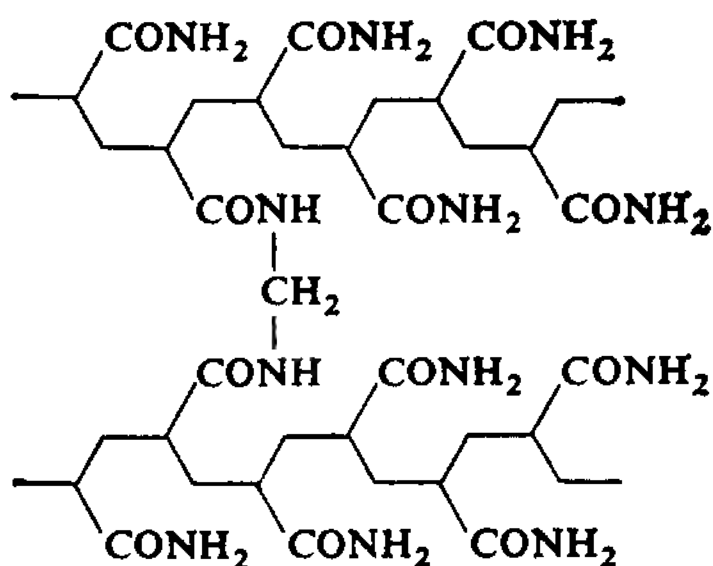
6.2.3. ПОЛИАКРИЛАМИДНЫЕ ГЕЛИ

Лид и Сехон [31], а также Хьертен и Мосбах [26] первыми предложили применять в гель-хроматографии гранулированные полиакриламидные гели. Эти полностью синтетические гели получают сополимеризацией акриламида $CH_2{=}CH{-}CONH_2$ и N,N′-метиленбис(акриламида)



$$CH_2{=}CH{-}CO{-}NH{-}CH_2{-}NH{-}CO{-}CH{=}CH_2,$$

причем последний является сшивающим агентом:



Меняя соотношение мономеров, можно получать гели с различной степенью сшивки, различной способностью к набуханию, а следовательно, и различными размерами пор, т. е. различными хроматографическими свойствами.

Полиакриламидные гели для гель-хроматографии получают эмульсионной полимеризацией. Их производит и поставляет в виде сухих порошков под названием «биогели» фирма Bio-

Rad Laboratories (Ричмонд, Калифорния, США). Подобно сефадексу, биогель представляет собой ксерогель, самопроизвольно набухающий при добавлении к нему воды с образованием частиц, пригодных для хроматографии. Выпускаются 10 марок этого материала с различными хроматографическими характеристиками; обозначают торговые марки биогеля буквой Р и числом (от Р-2 до Р-300) (табл. 6.3), это число, умноженное на 1000, соответствует верхнему пределу исключения для данного геля.

Биогель Р — синтетический полимер, и поэтому микроорганизмы его не разрушают. Он химически устойчив, однако относительно реакционноспособные амидные группы могут гидролизоваться при предельных значениях pH (особенно в щелочных средах) и образовывать свободные карбоксильные группы, в результате чего гель приобретает нежелательные ионообменные свойства. По данным фирмы, выпускающей биогель, содержание свободных карбоксильных групп очень мало: менее 2 мкэкв./г ксерогеля. Биогель устойчив в интервале pH от 1 до 10, в частности, устойчив в растворах мочевины, додецилсульфата натрия, гуанидингидрохлорида и в органических кислотах (муравьиной и уксусной). Однако Детерман [12] не рекомендует биогель для длительной работы при pH>9.

Биогель каждой марки выпускают в виде трех — четырех сортов, различающихся по размерам частиц. Благодаря этому можно подобрать такой гель, который обеспечит оптимальные условия элюирования и разделения. Самые крупные частицы размером 50—100 меш целесообразно применять в больших колонках, при больших скоростях потока и более концентрированных растворах, содержащих макромолекулы (см. разд. 6.6.1). Частицы размером 100—200 меш рекомендуются в тех случаях, когда не требуются очень большие скорости потока и можно ограничиться умеренно высоким разрешением. Максимальное разрешение дают самые тонкие частицы (200—400 меш) биогеля Р-2, Р-4 и Р-6, но скорость течения при этом снижается. Для ТСХ рекомендуют биогели других типов такой же грануляции.

Хроматографические свойства различных видов биогеля характеризуют их водоемкостью W_R; биогели ведут себя так же, как сефадексы, и величины W_R у них близки.

6.2.4. ОКСИАЛКИЛМЕТАКРИЛАТНЫЕ ГЕЛИ

Метод получения оксиалкилметакрилатных гелей разработали Чоупек и сотр. [7]; выпускает эти гели под названием «сферон» чехословацкая фирма Lachema в Брно.

Структура и химические свойства сферона рассматриваются в гл. 7, разд. 7.2.3. В настоящее время изготавливают пять

Таблица 6.3А

Технические характеристики сферонов[a]

Марка сферона	Предел исключения по молекулярным массам	Удельная поверхность, $м^2/г$	Размеры частиц (в набухшем состоянии), мкм
40	20 000—60 000	50—150	<25, 25—40, 40—63, 63—100
100	70 000—250 000	50—150	<25, 25—40, 40—63, 63—100
300	260 000—700 000	50—150	<25, 25—40, 40—63, 63—100, 100—200, 200—600
1000	800 000—5 000 000	50—150	<25, 25—40, 40—63, 63—100, 100—200, 200—600
100 000	>10 000 000[б]	200—270	<25, 25—40, 40—63, 64—100

[a] Отсортированные фракции всех видов сферона выпускает народное предприятие Lachema, Брно, ЧССР и экспортирует фирма Chemapol, Прага.

[б] Предел исключения сферона 100 000 определен по фазам штамма sd, хозяин *E. coli* СК.

видов этого геля: сферон 40, 100, 300, 1000 и 100 000 (табл. 6.3А). В продажу сферон поступает в сухом виде. Основными преимуществами его являются высокая механическая прочность и химическая стойкость. Механическая прочность сферона близка к прочности ионообменных смол, и хроматографирование на нем можно вести при высоких скоростях потока. Объем геля при набухании меняется ничтожно мало, а для набухания требуется около 4 ч. По своей внутренней структуре эти гели являются макросетчатым ксерогель-аэрогелевыми гибридами.

6.2.5. ГЕЛИ АГАРОЗЫ

Агароза — это полисахарид, входящий в состав агар-агара. Его молекулярные цепи состоят из чередующихся звеньев D-галактозы и 3,6-ангидрогалактозы:

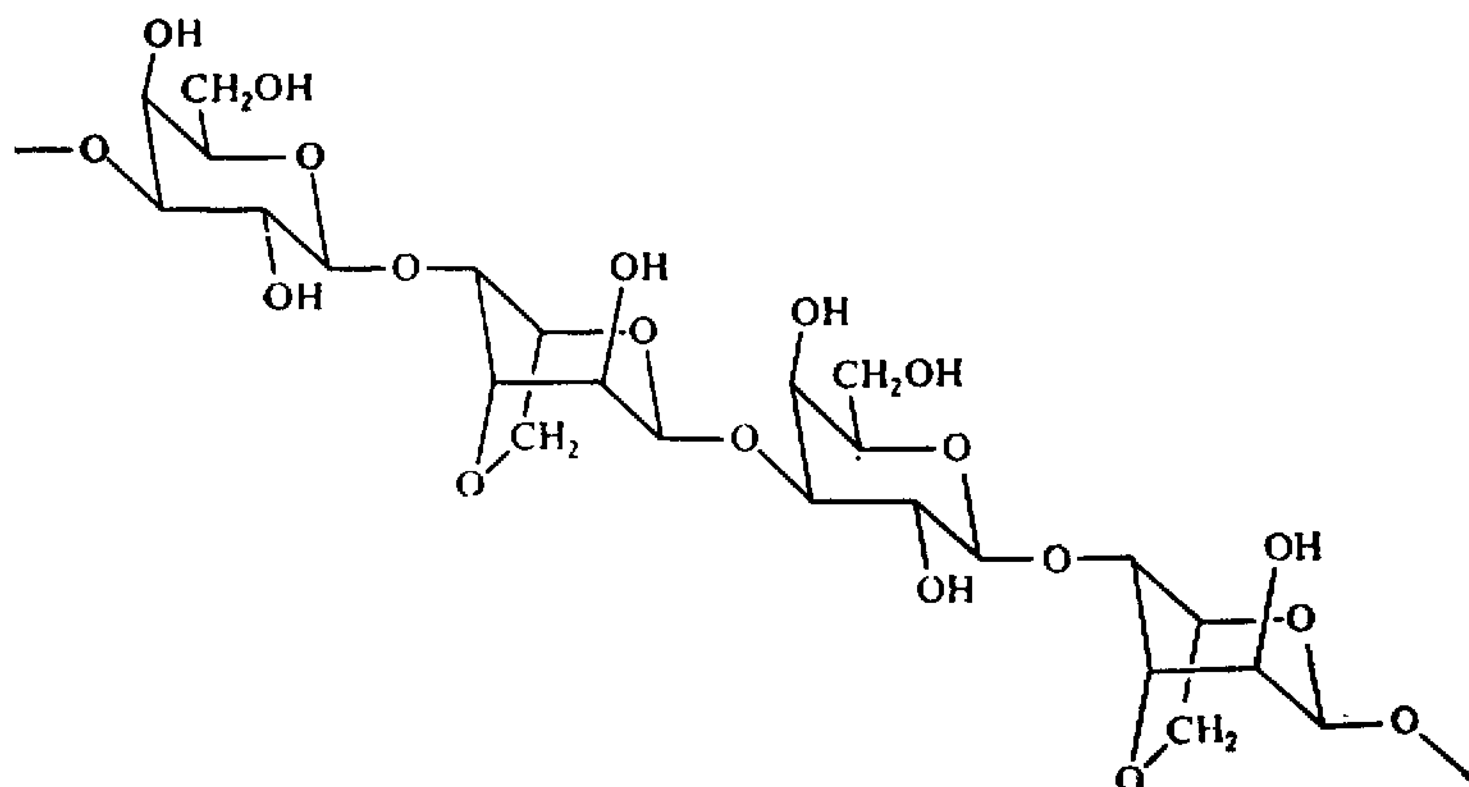


Таблица 6.4

Гели агарозы

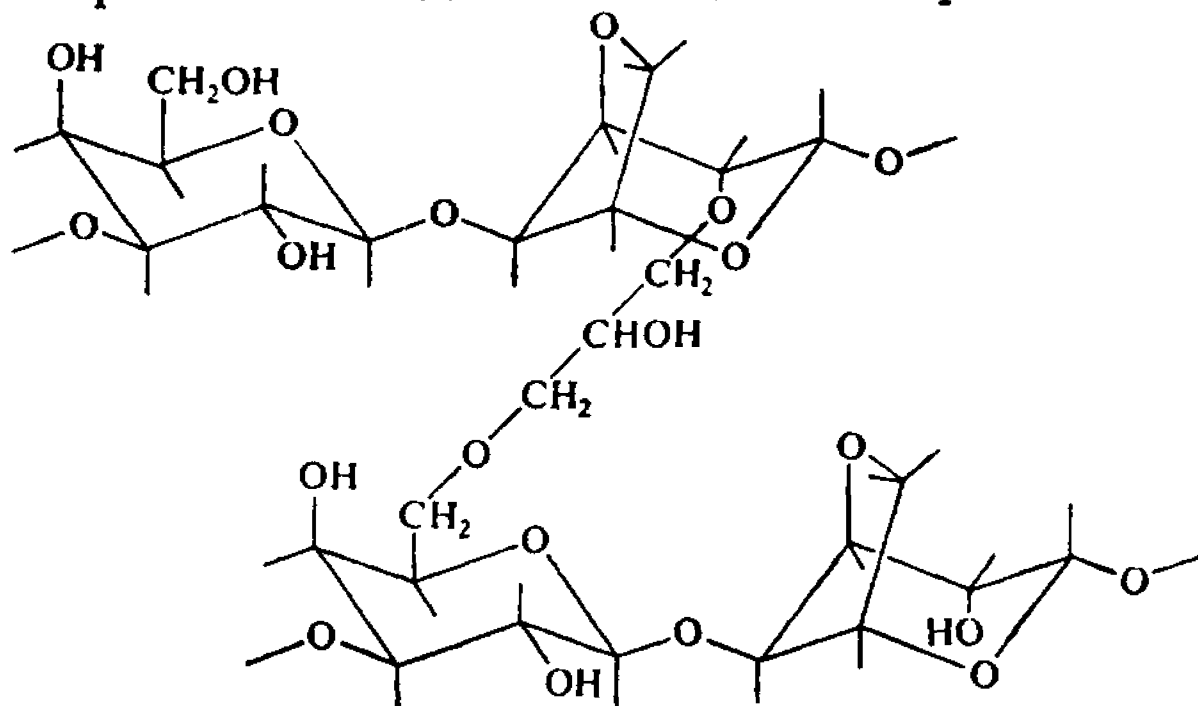
Марка геля	Размер частиц, мкм	Концентрация агарозы в геле, %	Предел исключения		Фирма
			полисахаридов	белков	
Сефароза					
6B	40—210	6	$1\cdot10^6$	$4\cdot10^6$	Pharmacia Fine Chemicals (Упсала, Швеция)
4B	40—190	4	$5\cdot10^6$	$20\cdot10^6$	
2B	60—250	2	$20\cdot10^6$	$40\cdot10^6$	
CL-6B	40—210	6	$1\cdot10^6$	$4\cdot10^6$	
CL-4B	40—190	4	$5\cdot10^6$	$20\cdot10^6$	
CL-2B	60—250	1	$20\cdot10^6$	$40\cdot10^6$	
Биогель					
A-0,5m		10		$5\cdot10^5$	Bio-Rad Laboratories (Ричмонд, Калифорния, США)
A-1,5m		8		$1,5\cdot10^6$	
A-5m	149—297	6		$5\cdot10^6$	
A-15m	74—149	4		$15\cdot10^6$	
A-50m	37—74	2		$50\cdot10^6$	
A-150m		1		$150\cdot10^6$	

Первым в гель-хроматографии был использован гранулированный гель агар-агара [42]. Однако более широкое распространение получила агароза, изготовленная в виде микрошариков по методу Хьертена [25]. В настоящее время агароза приготовляется и выпускается в продажу в различных видах, указанных в табл. 6.4 (см. также разд. 7.2.1).

Сшивки в геле агарозы обусловлены не ковалентными, а водородными связями между цепями полисахарида. Этим объясняется бо́льшая чувствительность агарозы к воздействию таких реагентов, которые способны разрушать водородные связи. Агароза устойчива в интервале pH 4—9 и в интервале температур 1—40 °С. Относительно концентрированные растворы солей, например 1М раствор хлорида натрия, или мочевины (до 2М) не влияют на хроматографические свойства агарозы.

Гели агарозы выпускаются в виде водных суспензий с добавкой 0,02% азида натрия в качестве консервирующего агента. Их нельзя сушить с помощью органических растворителей или вымораживания. Эти гели имеют относительно хорошие механические свойства, благодаря чему их можно использовать при довольно высоких скоростях течения (в этом они превосходят сефадекс G-200 и биогели Р-200 и Р-300). Интервалы фракционирования, получаемые на некоторых гелях агарозы, частично перекрывают интервалы фракционирования, получаемые на сефадексе G и биогеле Р. Поэтому целесообразно по возможности вместо сильно набухающих и мягких сефадексов G и биогелей Р применять гели агарозы.

В 1975 г. фирма Pharmacia Fine Chemicals выпустила в продажу новые гели — сефарозу CL2B, 4B и 6B [40]. Эти материалы были получены посредством ковалентного сшивания 2,3-дибромпропанолом одиночных цепей агарозы.



Сшитые гели агарозы типа сефароза CL обладают в принципе такой же пористостью, что и исходный гель сефароза, но отличаются от него значительно большей химической и термиче-

ской устойчивостью. Их можно применять для гель-хроматографии даже в сильно денатурирующих средах, например 6М растворе гуанидингидрохлорида, и в органических растворителях. Эти гели можно также повторно автоклавировать и проводить хроматографирование на них при повышенных температурах, вплоть до 70 °С.

6.2.6. ДРУГИЕ ГЕЛИ

УЛЬТРАГЕЛИ

Недавно фирма LKB Produkter, Bromma (Швеция) начала выпускать в продажу (под названием, «ультрагель») гели, получаемые из агарозы и полиакриламида (табл. 6.5). Эти материалы выпускаются в виде очень жестких шариков диаметром 60—140 мкм, набухающих в воде. Благодаря сочетанию акриламида с агарозой эти гели отличаются значительной прочностью и могут выдерживать более высокие давления, чем другие пористые гели с такими же химическими свойствами. Применяя четыре вида ультрагеля, в водных растворах можно провести фракционирование соединений с молекулярными массами от $6\cdot10^3$ до 10^6.

ПОЛИСТИРОЛЬНЫЕ ГЕЛИ

Для разделения липофильных соединений в органических растворителях пригодны полистирольные гели (табл. 6.6).

Материалы типа биобедс S, выпускаемые фирмой Bio-Rad Laboratories (США), представляют собой сополимеры стирола и дивинилбензола, которые при набухании в органических растворителях образуют ксерогели. Даже при малом количестве сшивающего агента размер пор остается настолько маленьким, что предел исключения составляет всего 14 000. К этой же группе гелей относится порагель, выпускаемый фирмой Waters Associates.

Эта же фирма выпускает макропористые полистирольные гели — стирагели, представляющие собой ксерогель-аэрогелевые гибриды. Эти материалы химически и механически очень устойчивы, обладают отличными хроматографическими характеристиками, при набухании объем их очень мало меняется. К гелям этого же типа относится биобедс SM.

Аквапак — макропористый полистирольный гель, выпускаемый фирмой Waters Associates, — предназначен для работы с водными растворами. Полистирольная матрица до определенной степени сульфируется, и в результате гель приобретает

Таблица 6.5

Ультрагели[а]

Марка ультрагеля	Концентрация акриламида, %	Концентрация агарозы, %	Интервал фракционирования[б]	Максимальная скорость потока[в], мл·см$^{-2}$·ч$^{-1}$		Скорость потока при оптимальном разделении, мл·см$^{-2}$·ч$^{-1}$
				А	Б	
AcA22	2	2	$6\cdot10^4$—$1\cdot10^6$	18	1—2	1—2
AcA34	3	4	$2\cdot10^4$—$4\cdot10^5$	40	8	3—5
AcA44	4	4	$12\cdot10^3$—$13\cdot10^4$	45	10	3—5
AcA54	5	4	$6\cdot10^3$—$7\cdot10^4$	50	12	3—5

[а] Ультрагель — гель, выпускаемый фирмой LKB Produkter, Bromma (Швеция).
[б] Для глобулярных белков.
[в] А — только для колонок размером 1,6×15 см, Б — для колонок размером до 2,5×100 см.

Таблица 6.6

Полистирольные гели

Марка геля	Интервал фракционирования или предел исключения [а]	Применяемые растворители	Химическая природа геля	Тип геля	Фирма
Биобедс					
S-X1	600—14 000	Органические растворители [б]	Сополимер стирола и дивинилбензола	Ксерогель	Bio-Rad Laboratories, Ричмонд, Калифорния (США)
S-X2	100—2 700				
S-X3	2000				
S-X4	1400				
S-X8	1000				
S-X12	400				
SM-2	600—1400			Макропористый ксерогель-аэрогелевый гибрид	
Порагель					
27121	2400				
27123	4000				
27125	8000				Waters Associates, Framingham, Mass., (США)
27126	20 000				

Марка геля	Интервал фракционирования или предел исключения[а]	Применяемые растворители	Химическая природа геля	Тип геля	Фирма
Стирагель					
39720	$16 \cdot 10^2$		Макропористый сшитый полистирол	Макропористый ксерогель-аэрогелевый гибрид	Waters Associates, Framingham, Mass., (США)
39721	$4 \cdot 10^3$				
39722	$14 \cdot 10^3$				
39723	$25 \cdot 10^3$				
39724	$8 \cdot 10^4$				
39725	$2 \cdot 10^5$				
39726	$6 \cdot 10^5$				
39727	$2 \cdot 10^6$				
39728	$6 \cdot 10^6$				
39729	$28 \cdot 10^6$				
39730	$2 \cdot 10^8$				
39731	$4 \cdot 10^8$				
Аквапак					
А 440	$1 \cdot 10^5$	Водные растворы высокой ионной силы	Сульфированный макропористый сшитый полистирол		Waters Associates, Framingham, Mass., (США)

[а] Предел исключения для всех гелей, кроме аквапака, оперделен по полистиролу.

[б] Бензол, толуол, ксилол, тетрахлорметан, диметилформамид, кетоны, диметилсульфоксид, хлорпроизводные углеводородов, тетрагидрофуран и т. п.

ионообменные свойства, что мешает гель-хроматографии. Чтобы подавить нежелательный эффект, рекомендуется использовать растворы большей ионной силы.

ПОЛИВИНИЛАЦЕТАТНЫЕ И ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЕВЫЕ ГЕЛИ

Поливинилацетатные гели, называемые фрактогелями PVA (табл. 6.7), выпускает фирма E. Merck, Darmstadt (ФРГ). Их получают сополимеризацией поливинилацетата с дивиниловым эфиром бутандиола-1,4 и применяют для разделения соединений в органических растворителях. Поливинильная матрица этих гелей набухает умеренно, и получающиеся полужесткие частицы выдерживают повышенное давление.

Полиэтиленгликолевые гели, выпускаемые той же фирмой под названием «фрактогель PGM 2000», можно рекомендовать для разделения как в органических, так и в водных средах.

Таблица 6.7

Фрактогели[а]

Марка фрактогеля	Предел исключения[б]	Применяемые растворители	Химическая природа геля
PVA 500	$5 \cdot 10^2$	Органические растворители	Поливинилацетатный гель
PVA 2000	$2 \cdot 10^3$		
PVA 6000	$6 \cdot 10^3$		
PVA 20 000	$2 \cdot 10^4$		
PVA 80 000	$8 \cdot 10^4$		
PVA 300 000	$3 \cdot 10^5$		
PVA 1 000 000	$1 \cdot 10^6$		
PGM 2000	$2 \cdot 10^3$	Водные растворы, органические растворители	Полиэтиленгликольдиметакрилат

[а] Фрактогель — новое название геля, выпускаемого фирмой E. Merck, Darmstadt (ФРГ), прежнее название — меркогель OR.

[б] Предел исключения для фрактогелей PVA определен по полистиролу в тетрагидрофуране, а для фрактогеля PGM — по полиэтиленгликолю в воде.

ПОРИСТЫЙ СИЛИКАГЕЛЬ И ПОРИСТОЕ СТЕКЛО

Пористый силикагель (табл. 6.8) и пористое стекло (табл. 6.9) — примеры твердых неорганических гелей. Их жесткую несжимаемую матрицу пронизывают поры и узкие каналы, диаметры которых меняются в относительно узком интервале.

Таблица 6.8

Силикагели, предназначенные для гель-хроматографии[а]

Марка геля	Предел исключения[в]	Примерный диаметр пор, нм	Тип геля	Фирма
Фрактосил[б]				
200		20	Аэрогель	E. Merck, Darmstadt, (ФРГ).
500		50		
1000		100		
2500		250		
5000		500		
10 000		1000		
25 000		2500		
Порасил				
60	$6 \cdot 10^4$		Аэрогель	Waters Associates, Framingham, Mass., (США).
250	$2,5 \cdot 10^5$			
400	$4 \cdot 10^5$			
1000	10^6			
1500	$1,5 \cdot 10^6$			
2000	$2 \cdot 10^6$			

[а] Применяются с водными растворами и органическими растворителями.
[б] Новое название геля, прежде выпускаемого под названием «Меркогель SI».
[в] Предел исключения определен по полистиролу.

Силикагель применяют главным образом для разделения в водных растворах, на нем можно проводить также разделение липофильных соединений в органических растворителях. Оба типа силикагеля, выпускаемые для гель-хроматографии, не набухают и обладают отличной проницаемостью даже при повышенных давлениях. Поэтому гелями этого типа, например порасилом и фрактосилом, заполняют колонки для ЖХВД. Однако на поверхности этих гелей имеются активные центры, на которых может происходить нежелательная в данном случае адсорбция разделяемых соединений. Чтобы исключить вероятность адсорбции, гели дезактивируют, этерифицируя гидроксильные группы.

Основные достоинства пористого стекла (табл. 6.9) заключаются в том, что на свойства заполняющего материала и на размеры пор не влияют ни химическая природа растворителя, ни его pH и ионная сила, ни даже скорость потока и давление. Поскольку размеры пор у пористого стекла примерно оди-

Таблица 6.9

Виды пористого стекла, предназначенного для гель-хроматографии[а]

Марка стекла[б]	Интервал фракционирования[в]	Тип геля	Фирма
Биоглас			
200	$3\cdot10^3$—$3\cdot10^4$		
500	$1\cdot10^4$—$1\cdot10^5$		
1000	$5\cdot10^4$—$5\cdot10^5$	Аэрогель	Bio-Rad Laboratories, Ричмонд, Калифорния, (США).
1500	$4\cdot10^5$—$2\cdot10^6$		
2500	$8\cdot10^5$—$9\cdot10^6$		
CPG-10			
75	$3\cdot10^3$—$3\cdot10^4$		
120	$7\cdot10^3$—$13\cdot10^4$		
170	$12\cdot10^3$—$4\cdot10^5$		
240	$22\cdot10^3$—$12\cdot10^5$		
350	$4\cdot10^4$—$5\cdot10^6$	Аэрогель	Corning Glass Works, Corning, N. Y., (США).
500	$7\cdot10^4$—$1\cdot10^7$		
700	$13\cdot10^4$—$3\cdot10^7$		
1000	$25\cdot10^4$—$1\cdot10^8$		
1400	$4\cdot10^5$—$3\cdot10^8$		
2000	$7\cdot10^5$—$9\cdot10^8$		
3000	$12\cdot10^5$—$27\cdot10^8$		

[а] Применяются с водными растворами и органическими растворителями.

[б] Числа, входящие в название марки стекла, соответствуют диаметру пор в нанометрах.

[в] Для стекол биоглас получены с полистиролом в толуоле.

[г] CPG — стекло с порами контролируемого размера; наименования типов пористого стекла CPG-10 взяты из каталога Serva Feinbiochemica 1975, Heidelberg, BDR.

наковы, разделение идет с хорошим разрешением. Благодаря жесткости матрицы допустимы высокие давления и большие скорости потока. Пористое стекло химически стойко по отношению почти ко всем жидкостям, кроме фтористоводородной кислоты и горячих щелочей, так что его можно чистить горячей азотной кислотой, а если необходимо, то стерилизовать при температуре до 500 °С. На пористое стекло не действуют ни микроорганизмы, ни ферменты.

6.3. МЕТОДИКА ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИИ

6.3.1. ОБОРУДОВАНИЕ, КОЛОНКИ, СОЕДИНИТЕЛЬНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ И СПОСОБЫ РЕГУЛИРОВАНИЯ СКОРОСТИ ПОТОКА

Разделение методом гель-хроматографии можно проводить с помощью простых технических средств, хотя в некоторых случаях требуется более сложное оборудование. Для разделения методом гель-хроматографии, как и для разделения другими методами жидкостной колоночной хроматографии, необходимы колонка, приспособление для регулирования скорости потока и сборник фракций. Чтобы ускорить и облегчить оценку результатов разделения, применяют соответствующие контрольно-регулирующие приборы.

Колонки для гель-хроматографии должны удовлетворять следующим требованиям, обусловленным хроматографическими и механическими свойствами гелей.

а. На дне колонки под заполняющим эту колонку гелем должен находиться поддерживающий слой, обеспечивающий свободное истечение растворов из нее. Проще всего использовать для этого стеклянную вату. Очень часто в колонки впаивают пластинки из пористого стекла, поры в которых, однако, не должны быть слишком тонкими, иначе мягкие гели закупорят их. Чтобы избежать такого закупоривания, можно поместить на пористую пластинку кружок фильтровальной бумаги или слой маленьких стеклянных шариков, тогда гель не будет непосредственно соприкасаться с пластинкой. В качестве материала для поддерживающего слоя очень часто используют пластинки из пористого пластика, в частности пористого полиэтилена, выпускаемого под названием «вион» (Porous Plastic, Дагенгейм, Англия).

Чтобы гель не закупоривал такие пластинки, их помещают гладкой стороной к гелю. Отделить гель от пористой пластинки можно также прокладкой из тонкой полиамидной ткани.

б. Мертвый объем ниже поддерживающего слоя должен быть возможно меньшим, чтобы в нем не происходило смешивания и растекания узких хроматографических зон, образовавшихся при разделении в колонке. Иногда целесообразно заполнить указанный объем стеклянными шариками, поместив их, например, под фильтром из пористого стекла.

в. Вывод из колонки должен заканчиваться наконечником для подсоединения пластиковой капиллярной трубки, через которую жидкость из колонки поступает в детектор и сборник. Благодаря малому диаметру трубки в ней не происходит размывание зон.

г. Колонки должны быть изготовлены таким образом, чтобы выходящий поток, содержащий разделяемые соединения, не контактировал с металлическими деталями, так как некоторые ферменты при этом теряют активность или полностью разлагаются. Лучше всего пользоваться стеклянными колонками и пластмассовыми трубками (например, из пластмассы перспекс).

Для восходящего хроматографирования (см. разд. 6.3.6) нужны колонки специальной конструкции, в которых слой геля ограничен двумя плунжерами таким образом, чтобы объем мертвого пространства снизу и сверху колонки был минимальным. Колонки такого типа описали Порат и Беннич [43]. Хроматографические колонки различных размеров и типов, от аналитических и препаративных до пилотных, выпускают многие фирмы, специализирующиеся на производстве хроматографического оборудования. Колонки, выпускаемые фирмой Pharmacia Fine Chemicals, специально предназначены для гель-хроматографии.

Основные элементы конструкции колонок представлены схематически на рис. 6.3. Элюент поступает в колонку и выте-

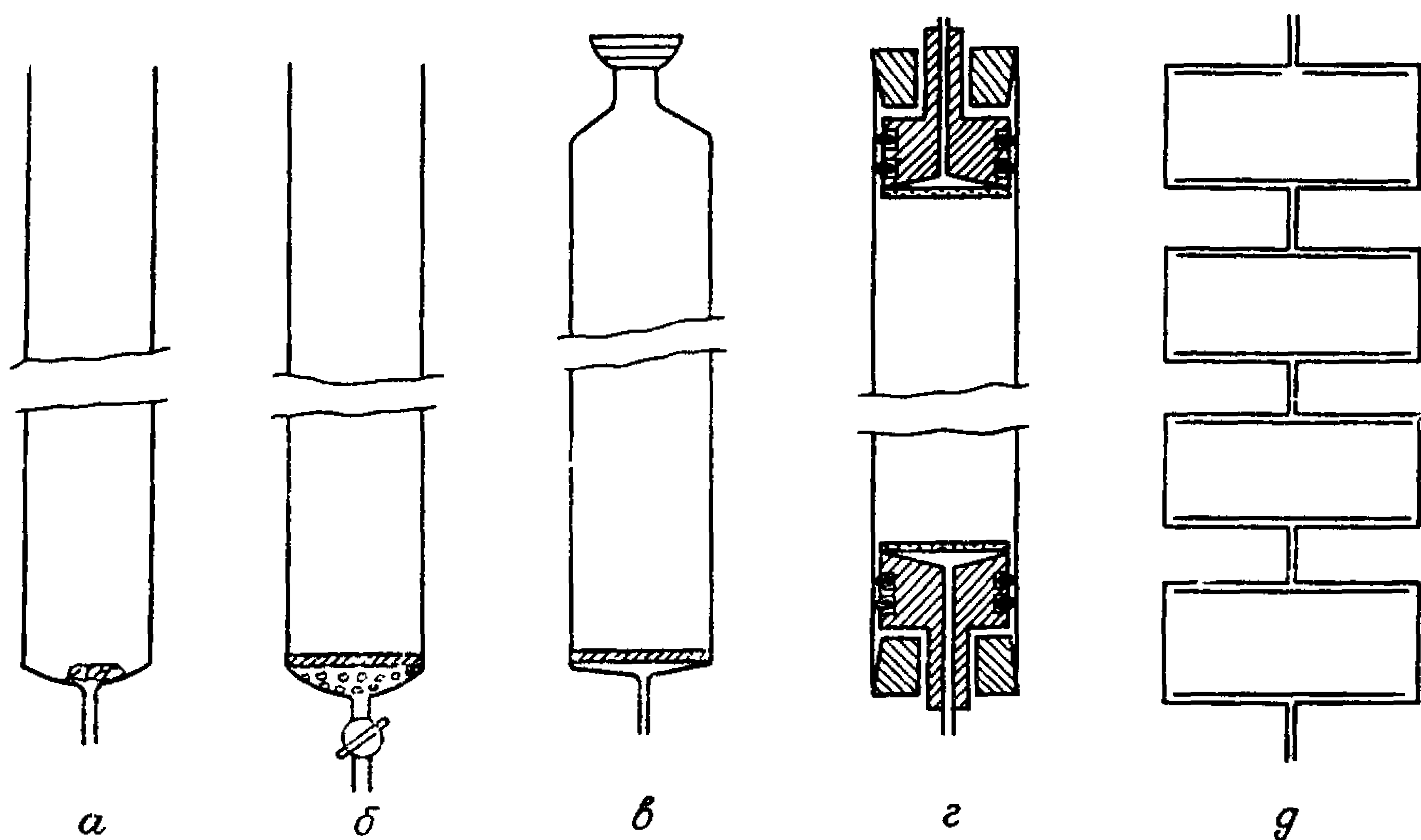


Рис. 6.3. Основные типы колонок.

а — наиболее простая стеклянная колонка с выходным концом в виде капилляра, над которым находится тампон из хлопковой ваты; *б* — стеклянная колонка со впаянной пластинкой из пористого стекла, снабженная капиллярным краном; чтобы уменьшить мертвый объем, пространство под пластинкой заполняют стеклянными шариками; *в* — стеклянная колонка, снабженная сверху соединением на сферическом шлифе, а снизу вытянутая в капилляр; мертвый объем под пластинкой из пористого стекла минимален; *г* — колонка с плунжерами; дно каждого плунжера образовано пористым слоем, оба плунжера закреплены прокладками и специальными конусами, предохраняющими их от сдвига; *д* — многосекционная препаративная колонка; каждая секция оснащена пористыми опорными пластинками и трехходовым краном, диаметр одной секции 37 см, ее высота 15 см, емкость 16 л; такие колонки для препаративной хроматографии KS370 выпускает фирма Pharmacia.

кает из нее через тонкие мягкие полиэтиленовые или поливинилхлоридные трубки. Для колонок диаметром до 5 см применяются трубки с внутренним диаметром 1—1,5 мм, а для колонок бóльших диаметров используют трубки с соответственно бóльшим внутренним диаметром (2—4 мм).

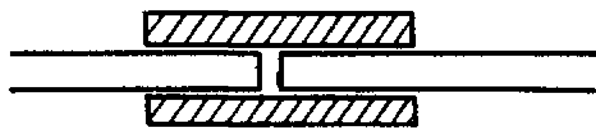


Рис. 6.4. Соединение двух трубок.

Штриховкой показано крепление с помощью отрезка мягкой трубки из тигона или силиконовой резины, внутренний диаметр которого равен или немного меньше внешнего диаметра соединяемых трубок.

Разделение методом гель-хроматографии обычно проводят при низком избыточном давлении (порядка десятков сантиметров водяного столба), и поэтому, как показано на рис. 6.4, соединять трубки с жесткими стенками можно с помощью коротких трубок из мягкого пластика (силиконовая резина, тигон и т. п.). Фирмы, производящие хроматографическое оборудование, изготовляют различные соединительные устройства, а также вентили для регулирования потока (см. гл. 8, разд. 8.2), позволяющие работать при повышенном давлении.

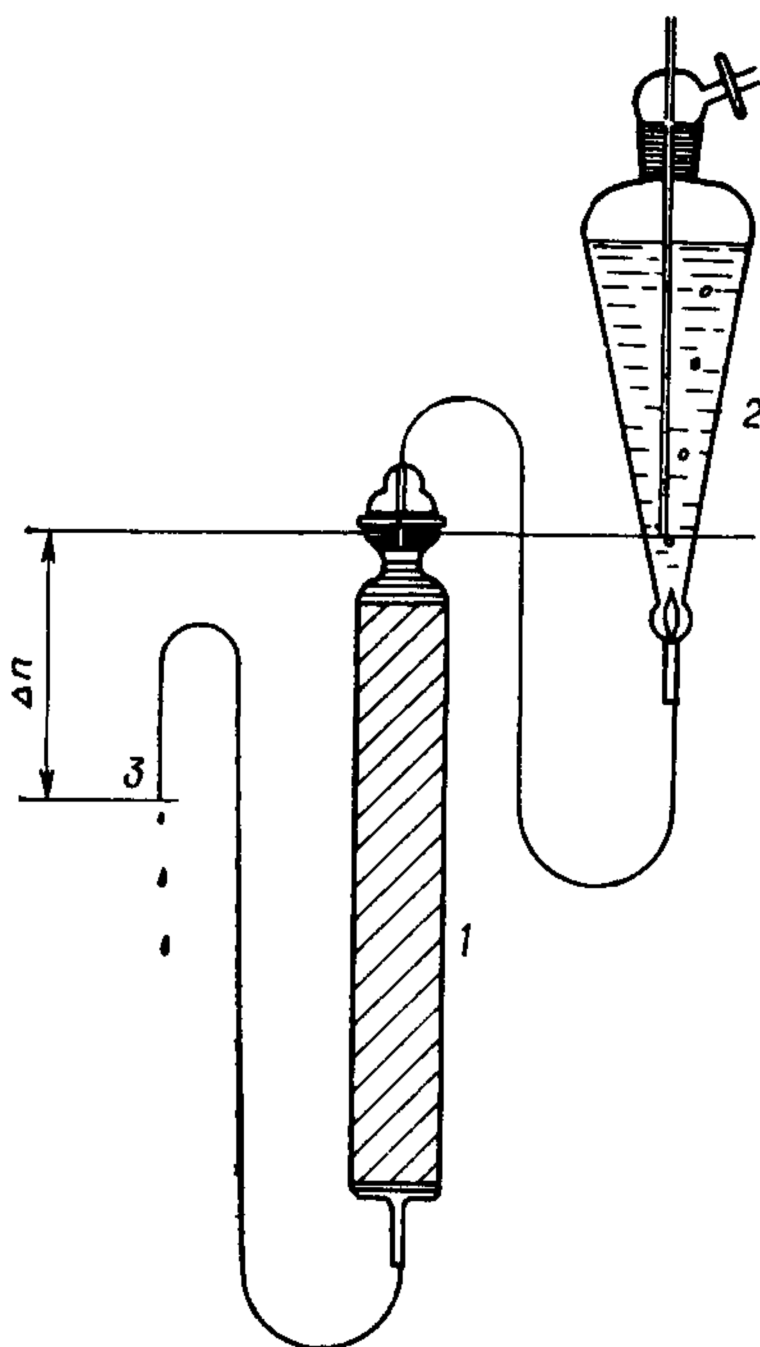


Рис. 6.5. Схема простого прибора для гель-хроматографии.

1 — хроматографическая колонка со слоем геля; 2 — сосуд Мариотта, используемый также как резервуар для элюента; 3 — вывод из колонки; Δh — рабочее давление (разность гидростатических давлений на указанных уровнях).

Поток элюента перемещается по колонке или под действием силы тяжести (в этом случае ввод в колонку расположен выше вывода из колонки), или с помощью насосов (см. разд. 8.2). В первом случае понижение уровня элюента в верхнем резервуаре, происходящее в ходе элюирования, приводит к уменьшению гидростатического давления и, следовательно, к уменьшению скорости потока. Чтобы избежать этого, используют принцип сосуда Мариотта. Резервуаром для элюента служит делительная воронка емкостью до 2 л. На рис. 6.5 показана схема простой установки для гель-хроматографии. Для некоторых видов гель-хроматографии (см. разд. 6.4.2) необходимы насосы, позволяющие регулировать скорости потока элюента. Для работы с мягкими гелями более удобен перистальтический насос, так как поршневой насос может вызвать пульсацию давления, в результате которой может нарушиться проницаемость слоя геля.

6.3.2. ВЫБОР ГЕЛЯ

Подбирая гель, следует учитывать его тип и размеры частиц. В принципе методом гель-хроматографии проводят два вида разделения: групповое разделение и фракционирование. В первом случае содержащиеся в пробе соединения делят на две группы: соединения большей молекулярной массы, которые не удерживаются гелем и элюируются объемом элюента, равным свободному объему, и низкомолекулярные соединения, которые могут диффундировать внутрь геля и элюируются объемом элюента, приблизительно равным общему объему слоя геля V_t. Групповое разделение часто называют обессоливанием даже в тех случаях, когда его целью является извлечение низкомолекулярных примесей, отличающихся от солей. Во втором случае — при фракционировании — разделяют более сложные смеси довольно сходных соединений, различающихся по характеру их диффузии внутрь геля. Последовательность элюирования этих соединений из гелей определяется величинами K_D.

Для группового разделения надо подобрать такой тип геля, из которого вместе с объемом элюента, равным свободному объему геля, можно элюировать самый низший компонент группы высокомолекулярных соединений и, таким образом, четко отделить его от действительно низкомолекулярных соединений (солей, мочевины и т. п.). Белки, нуклеиновые кислоты и подобные соединения разделяют на таких гелях, как сефадекс G-25 и G-50, биогель Р-6 и Р-10. Для отделения пептидов и других низкомолекулярных полимерных соединений целесообразнее использовать сефадекс G-10 и G-15, а также биогель Р-2 и Р-4. В то же время для фракционирования следует под-

бирать гель таким образом, чтобы разделяемые соединения элюировались не вместе со свободным объемом элюента, а по возможности в пределах всего интервала фракционирования для данного вида геля. Соединение, которое следует выделить, обычно находится в смеси с веществами и более низкой, и более высокой молекулярной массы, поэтому надо выбрать такой гель, для которого данное соединение находится в середине интервала фракционирования.

В отношении выбора размеров частиц существует общее правило. Если основное значение имеет скорость разделения (т. е. необходимо обеспечить незатрудненное и быстрое течение элюента), а четкость разделения не столь важна, можно использовать гель с частицами большого размера. Однако если важно получить очень четкое разрешение, пусть даже в результате увеличения длительности анализа, то следует предпочесть гель с малыми или даже очень малыми частицами.

6.3.3. ПОДГОТОВИТЕЛЬНЫЕ РАБОТЫ

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ГЕЛЯ

Поставляемые в виде суспензий гели тщательно промывают (лучше всего на воронке Бюхнера) и затем суспендируют в буферном растворе или в том растворителе в котором должно проводиться разделение. Если гель поставляется в сухом виде, ему необходимо дать набухнуть. Для полного набухания гелей с очень большой величиной W_R требуется длительное время. В табл. 6.10 и 6.11 указана минимальная длительность набухания биогеля и сефадекса. Процесс набухания можно проводить непосредственно в том буферном растворе, который используется для хроматографирования. Набухание ускоряют, погружая сосуд со взвесью геля (обязательно в воде или дру-

Таблица 6.10

Минимальная длительность набухания биогелей

Марка биогеля	Минимальное время, ч	
	при 20 °С	в бане с кипящей водой
Р-2, Р-4, Р-6, Р-10	4	2
Р-30, Р-60	12	3
Р-100, Р-150	24	5
Р-200, Р-300	48	5

Таблица 6.11

Минимальная длительность набухания сефадексов

Марка сефадекса	Минимальное время, ч	
	при комнатной температуре	в бане с кипящей водой
G-10, G-15	3	1
G-25, G-50, G-75	24	3
G-100, G-150, G-200	72	5
LH-20	3	

[a] До температуры, близкой к температуре кипения воды, сефадекс можно нагревать только в нейтральных средах.

гой нейтральной среде) в баню с кипящей водой; затем гель охлаждают.

Набухший гель перемешивают с буферным раствором и оставляют его на некоторое время. Если при оседании геля жидкость над слоем остается мутной, то необходимо удалить декантацией мельчайшие частицы геля, вызывающие помутнение. С этой целью гель суспендируют в избытке воды или буферного раствора, очень осторожно перемешивают и дают ему отстояться, пока не осядут все твердые частицы, за исключением очень мелких. После этого можно декантировать жидкость вместе с этими мельчайшими частицами. При необходимости эту операцию следует повторить. Удалять из геля очень мелкие частицы необходимо потому, что они ухудшают его проницаемость.

ЗАПОЛНЕНИЕ КОЛОНКИ

Заполнение колонки — одна из наиболее важных операций в гель-хроматографии, так как именно она определяет в первую очередь качество разделения. Колонку заполняют суспензией набухшего стабилизованного геля, из которого удалены мелкие частицы. При оптимальной плотности этой суспензии объем светлой жидкости после оседания геля составляет около 50% объема осевшего геля. Избыток жидкости декантируют. Гель осторожно перемешивают и при пониженном давлении (водоструйный насос) обезгаживают. После такой обработки гель можно вводить в колонку.

Пустую колонку закрепляют в вертикальном положении (лучше по отвесу), выводную трубку и донную часть колонки заполняют на высоту до 6 см обезгаженным буферным рас-

твором и затем перекрывают вывод из колонки. Под поддерживающим слоем при этом не должно оставаться пузырьков воздуха. Далее на колонку помещают устройство для заполнения. Удобнее всего трубка того же диаметра, что и колонка, длиной около 2/3 длины колонки или удлиненная коническая воронка с диаметром выводного отверстия, равным диаметру колонки (см. гл. 5, рис. 5.10, *б*). Приготовленную взвесь геля осторожно перемешивают, чтобы получилась однородная суспензия, и аккуратно выливают в трубку или воронку. После того как в колонку введена вся суспензия, некоторое время выжидают, наблюдая за оседанием геля. Когда высота слоя осевшего геля достигнет примерно 5 см (через 5—10 мин, в зависимости от типа геля), открывают выводное отверстие колонки и пропускают через нее поток растворителя. Скорость вытекания растворителя из колонки должна быть меньше скорости потока при хроматографировании. При заполнении колонок «твердыми» гелями трудностей не возникает. Получить равномерный однородный слой «мягкого» геля сложнее, в частности разность гидростатических давлений должна быть минимальной (см. гл. 6, рис. 6.5). После того как весь гель осядет, устройство для заполнения снимают с колонки и промывают хроматографический слой с целью его стабилизации таким объемом растворителя, который по меньшей мере равен объему слоя. При элюировании надо постепенно увеличивать гидростатическое давление или задаваемую насосом скорость потока, пока они не достигнут требуемых значений. Рабочие давления для биогеля указаны в табл. 6.3, а для сефадекса — в табл. 6.12.

Таблица 6.12

Рабочие давления, обеспечивающие максимально допустимую скорость потока в колонках, заполненных сефадексом с высокой водоемкостью W_R [37]

Марка сефадекса	Давление, % высоты слоя
G-75	100
G-100	50
G-150	20
G-200	10

ПРОВЕРКА ПРАВИЛЬНОСТИ ЗАПОЛНЕНИЯ КОЛОНКИ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ V_0

Правильность заполнения колонки лучше всего проверить, хроматографируя на ней какие-либо окрашенные соединения. С этой целью, например, удобно использовать синий декстран

2000 (Pharmacia Fine Chemicals) — высокомолекулярный декстран с химически связанным синим хромофором. Этим способом можно в ходе одного опыта проверить качество заполнения колонки и определить свободный объем V_0. Для этого в колонку вводят 0,2%-ный раствор синего декстрана 2000 (1/50—1/100 объема слоя). Ионная сила элюента должна быть

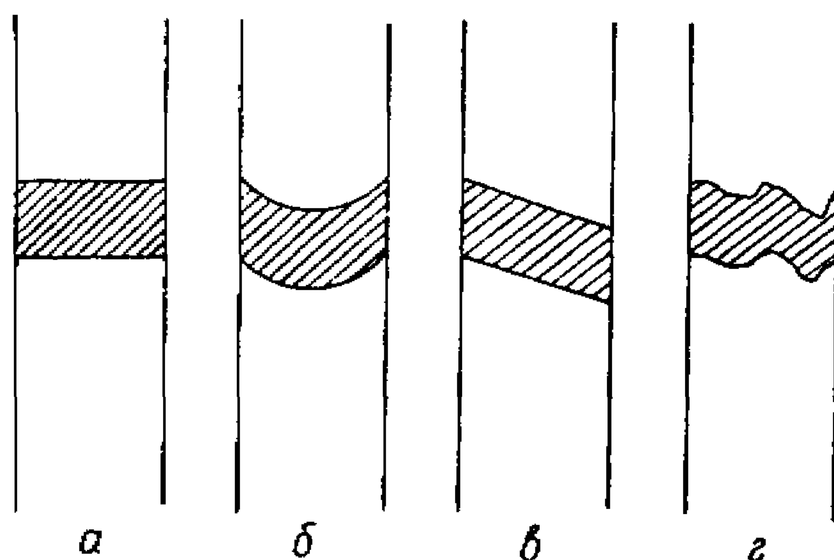


Рис. 6.6. Проверка качества заполнения колонки посредством определения формы хроматографической зоны (пояснения см. в табл. 6.13).

не менее 0,02. Различные формы зон, образующихся в ходе хроматографирования, указаны в табл. 6.13. Правильное заполнение колонки является важным условием эффективного разделения. Если во время испытательного хроматографирования с применением синего декстрана наблюдают неудовлетворительную форму зоны, это означает, что колонка заполнена неправильно и что ее следует заполнить заново.

При правильной форме хроматографической зоны следует определить исключенный объем колонки V_0 как объем элюата, вытекающий к моменту элюирования максимума пика. Если используются «твердые» сефадексы, то на их матрице иногда происходит частичная адсорбция синего декстрана. Адсорбированный синий декстран можно элюировать из колонки небольшим объемом раствора сывороточного альбумина.

6.3.4. РАЗМЕРЫ КОЛОНОК, ВЕЛИЧИНА ПРОБЫ И СКОРОСТЬ ПОТОКА

Размер колонки для гель-хроматографии непосредственно зависит как от объема пробы, которую необходимо разделить, так и от вида разделения — групповое разделение (обессоливание) или фракционирование. Групповое разделение проводят в более широких колонках, причем для большинства лабораторных задач достаточно, чтобы высота колонки равнялась 20—50 см. Отношение высоты колонки к ее диаметру может состав-

Таблица 6.13

Проверка качества заполнения колонки по форме зоны и характеру ее образования (таблица поясняет рис. 6.6)

Форма зоны	Причина	Качество разделения
Четкая горизонтальная (рис. 6,6, *а*)	Правильное заполнение хроматографическим слоем	Узкие пики, хорошее разрешение
Четкая, но искривленная (рис. 6.6, *б*)	Скорость потока в центре колонки больше, чем около стенок, что может быть обусловлено следующим: 1) заполнение велось слишком разбавленной суспензией; 2) скорость снижается у стенок слишком узких колонок (так называемый пристенный эффект)	
Четкая, но не горизонтальная (рис. 6.6, *в*)	1) Неравномерное осаждение геля при заполнении колонки (более крупные частицы геля оседают с той стороны, где больше скорость потока); 2) наличие температурного градиента по поперечному сечению колонки; 3) при заполнении колоики не была установлена строго вертикально	Широкие растекающиеся пики, потеря разрешения, разбавление проб
Вначале правильная, но в ходе хроматографирования искажающаяся (рис. 6.6, *в*, *г*)	Неправильности в заполнении колонки из-за применения слишком густой суспензии или из-за перерывов во время заполнения	
Неправильная (рис. 6.6, *г*)	1) Чаще всего неровности поверхиости заполняющего слоя; 2) чрезмерно вязкая проба — значительно более вязкая, чем элюент	

лять 5:1 или даже меньше. При большем диаметре колонки возможны более высокие скорости потока, в результате чего продолжительность разделения сокращается. Объем пробы для группового разделения может составлять до 25—30% объема хроматографического слоя.

Фракционирование более сложных смесей проводят в более узких и более длинных колонках. Высота обычных колонок до 100 см, но в ряде случаев применяют и значительно более длинные колонки. Увеличивая высоту колонки (при одном и том же геле), можно улучшить разделение. Однако очень длинные колонки трудно заполнять, и хроматографирование в них следует проводить при очень малых скоростях потока, в результате чего увеличивается продолжительность процесса. Чтобы разделение сложной смеси было хорошим, объем пробы не должен превышать 1—2% объема слоя. В большинстве случаев допустима скорость потока 10 мл·см$^{-2}$·ч$^{-1}$. При групповом разделении допустимы более высокие скорости течения, а при работе с мягкими гелями и на длинных колонках скорости потока должны быть ниже указанной величины, составляя иногда всего 1 мл·см$^{-2}$·ч$^{-1}$.

6.3.5. ВВОД ПРОБЫ

Помимо заполнения колонки, на качество разделения существенно влияет также способ ввода пробы в колонку. Наиболее простым является следующий метод. Избыток раствора над

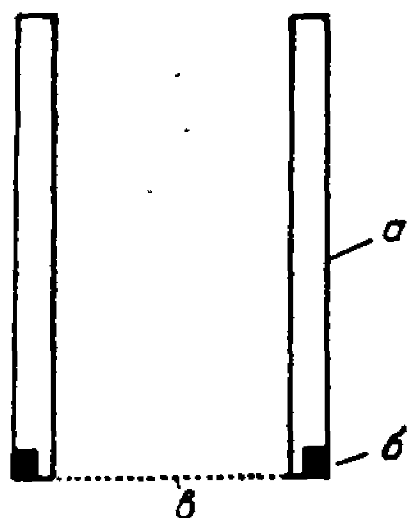


Рис. 6.7. Чашка для ввода пробы.
а — стенка цилиндра из метакрилата (плексигласа); *б* — поливинилхлоридное кольцо, удерживающее тонкую полиамидную ткань (*в*).

гелем отбирают пипеткой, а остатку дают войти в слой геля. После того как над слоем геля не останется жидкости, в колонку вводят пробу. Вводят ее пипеткой по стенке колонки, следя за тем, чтобы при этом не повреждалась поверхность геля и проба равномерно проникала внутрь него. Когда вся проба впитается в гель, стенки и верхнюю часть колонки дважды промывают небольшим количеством элюента, которому также дают впитаться в слой геля. Далее тщательно заполняют элюентом пространство над гелем и начинают хроматографирование. Чтобы не допустить нарушения формы поверхности геля и

обеспечить равномерное распределение пробы по всей этой поверхности, удобно, особенно при работе с более широкими колонками, положить на слой геля кружок тонкой фильтровальной бумаги. Для той же цели служат выпускаемые фирмой Pharmacia Chemicals специальные чашки для ввода проб (рис. 6.7). Для фракционирования или для определения моле-

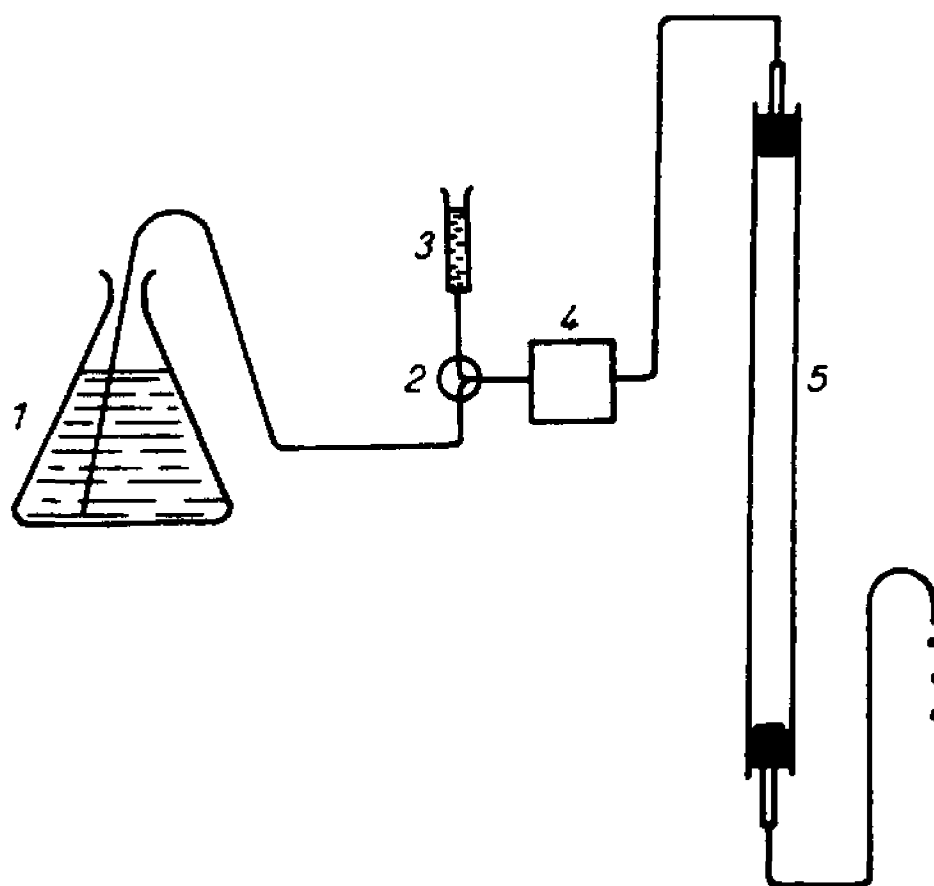


Рис. 6.8. Схема приспособления с трехходовым краном для ввода проб и проведения гель-хроматографии.

1 — резервуар для элюента; *2* — трехходовой кран (соединяет *1* с *4* или *3* с *4*); *3* — баллон стеклянного шприца; *4* — насос; *5* — заполненная гелем хроматографическая колонка.

кулярных масс (см. разд. 6.6.3) удобно приспособление, состоящее из резервуара с пробой и трехходового крана. Резервуаром для пробы может служить шприц. Такое приспособление схематически показано на рис. 6.8.

Если равномерность потока элюента через колонку обеспечивается посредством специального насоса, то лучше всего вводить пробу также с помощью этого насоса, погружая его вводную трубку в раствор пробы, а после того как проба полностью впитается, эту трубку следует перевести обратно в сосуд с элюентом. Можно также использовать приспособление с трехходовым краном, показанное на рис. 6.8. Лучше всего пользоваться перистальтическими насосами. Поршневые насосы менее удобны, так как при подаче пробы таким насосом происходит ее разбавление и распыление.

6.3.6. ВОСХОДЯЩАЯ ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИЯ

В обычном варианте гель-хроматографии элюент перемещается по колонке сверху вниз. В таких условиях мягкие гели способны уплотняться, что приводит к уменьшению высоты

хроматографического слоя по сравнению с исходным и уменьшению скорости потока элюента. Этого нежелательного эффекта можно избежать или по крайней мере свести его к минимуму, если направить поток элюента в обратном направлении — снизу вверх. Однако в этом случае требуются колонки, снабженные двумя плунжерами, прочно фиксирующими положение слоя геля. Если поток элюента движется сверху вниз, направление его перемещения и направление действия силы тяжести совпадают; если элюент подается снизу, то ему приходится преодолевать действие силы тяжести. При повторном использовании длинных колонок, заполненных очень мягкими гелями, возможно частичное уменьшение скорости потока. Если же элюент поступает в колонку снизу, то такую колонку можно многократно использовать, не заполняя ее заново. Имеющиеся в продаже штативы для крепления больших препаративных колонок снабжены болтом, облегчающим перевертывание колонки; менять направление потока элюента можно также с помощью многоходового крана.

Основное преимущество восходящего хроматографирования — возможность использования более высоких скоростей потока при работе с мягкими гелями. Однако, если плотность пробы значительно больше плотности элюента, метод восходящего хроматографирования неприменим, особенно для обессоливания, и даже в колонках с плунжерами направление потока должно быть нисходящим.

6.3.7. РЕГЕНЕРАЦИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ СЛОЕВ

В большинстве случаев по окончании хроматографирования, после того как все низкомолекулярные компоненты (соли) прошли через хроматографический слой, он остается пригодным для последующего применения и регенерировать его не требуется. Это большое преимущество гель-хроматографии. Однако после длительного использования колонки может оказаться, что твердые частицы, содержавшиеся в пробах и не удаленные при фильтровании или центрифугировании перед вводом проб, задерживаются на поверхности геля. Это приводит к закупорке колонки и снижению скорости фильтрации. В таких случаях достаточно извлечь из колонки непосредственно тот тонкий слой, в котором находятся эти примеси.

Белки иногда адсорбируются в небольших количествах на частицах геля, особенно если ионная сила растворителя мала. Склонность к адсорбции наиболее выражена у липопротеинов. Адсорбированные белки можно вытеснить из колонки зоной, например 1 М раствора хлорида натрия или 8 М раствора мочевины; величина pH этой регенерирующей жидкости должна

быть так подобрана, чтобы не нарушалась устойчивость геля. Сефадекс можно промывать зоной 0,5 М раствора гидроксида или хлорида натрия. От денатурированных белков сефадекс можно освободить, промывая его теплым 1%-ным раствором гидроксида натрия, так как этот гель устойчив по отношению к щелочным средам даже при повышенной температуре (в отличие от полиакриламидных гелей, которые легко гидролизуются).

Как правило, можно промывать хроматографический слой непосредственно в колонке, которая после этого становится пригодной для дальнейшего использования. Если промывание в колонке невозможно, то надо извлечь гель из колонки и промыть его на воронке Бюхнера с фильтром из пористого стекла, простерилизовать, вновь поместить в колонку и проверить качество ее заполнения.

6.3.8. ХРАНЕНИЕ ГЕЛЕЙ

Регенерированные гели можно хранить и в набухшем состоянии в виде водной суспензии, и в сухом виде. Гели агарозы можно хранить только в набухшем состоянии в жидкой среде. К подлежащему хранению набухшему гелю добавляют бактериостатический агент, чтобы ни в гель, ни в жидкость не попала инфекция (см. разд. 6.3.9).

Как показывает наш собственный многолетний опыт и опыт других исследователей [4], сефадекс серии G можно довольно долго хранить в набухшем состоянии в 2М уксусной кислоте в холодильнике. Если гель, помещенный уже в хроматографическую колонку, не будет сразу же использован, его также следует промыть 2М уксусной кислотой и хранить в ней, а непосредственно перед употреблением промыть соответствующим буферным раствором. Набухшие гели можно высушить и перевести в исходное порошкообразное состояние следующим способом. К хорошо промытому и освобожденному от солей гелю добавляют этанол (небольшие количества геля обрабатывают на воронке с фильтром из пористого стекла, большие количества — в пригодных для этого сосудах), осторожно перемешивают суспензию и дают ей отстояться. Жидкость над гелем отсасывают и эти операции повторяют до тех пор, пока не получатся высохшие частицы геля. Высушить твердые гели несложно. При сушке мягких гелей рекомендуется сначала добавлять 50%-ный этанол, а затем повышать его концентрацию. При добавлении спирта к суспензии мягких гелей, т. е. гелей с большим содержанием воды, поверхность частиц геля сильно обезвоживается и образуются комки, которые высушиваются с трудом. Если такие комки все-таки образовались, то лучше

дать им снова набухнуть и высушить гель заново, постепенно увеличивая концентрацию спирта. В процессе сушки жидкость из геля удаляют отсасыванием. Дегидратированный гель освобождают от остатков спирта сушкой на воздухе.

6.3.9. ПРЕДОХРАНЕНИЕ ОТ МИКРОБНОЙ ИНФЕКЦИИ

Гели декстрана и агарозы подвержены действию микроорганизмов (бактерий и плесени), вызывающих деградацию геля и изменение его хроматографических свойств. Кроме того, если хроматографирование ведется на инфицированном геле, выход разделенных соединений (биополимеров) уменьшается и в элюате появляются примеси. Хотя чисто синтетические гели, например полиакриламид, полиметилметакрилат, полистирол, сами и не разрушаются микробами, эти микробы могут расти в той среде, в которой суспендирован гель, а также на поверхности геля. В результате этого в элюате, полученном на гелях этого типа, также появляются примеси.

Поэтому, чтобы избежать инфицирования гелей, в суспензии гелей, заполненные колонки и элюенты добавляют бактериостазы, которые не должны реагировать ни с матрицей геля, ни с хроматографируемыми соединениями, не должны денатурировать или осаждать их. Если ход хроматографирования прослеживается по УФ-поглощению, то эти соединения не должны также поглощать в той спектральной области, которую используют для обнаружения. В самом начале развития гель-хроматографии был предложен в качестве бактериостазов ряд соединений, в частности толуол, фенол, крезол, формальдегид и хлороформ (см. также гл. 5, табл. 5.10). Однако фенолы и формалин вступают в реакцию с белками и вызывают необратимые их изменения. Хлороформ, который применяется в виде насыщенных водных растворов, непригоден для работы с мягкими гелями, так как вызывает уменьшение степени набухания и, таким образом, неблагоприятно влияет на хроматографические свойства этих гелей. Он также непригоден в тех случаях, когда колонки оснащены пластмассовыми трубками, так как повреждает их.

В настоящее время в качестве бактериостазы применяются следующие соединения. Азид натрия NaN_3, добавляемый в гели при хранении и в элюенты в виде 0,02%-ного раствора. Азид натрия — ионогенное соединение, препятствует антронной реакции. Хлоретон, 1,1,1-трихлор-*трет*-бутиловый спирт $Cl_3CC(OH)(CH_3)_2$, применяют в гель-хроматографии в концентрациях 0,01—0,02%. Он весьма эффективен в слабокислой среде, но разрушается в сильнощелочной среде и при нагревании выше 60 °С; хлоретон электронейтрален и не мешает антронной

реакции. Хибитан R или хлоргексидин (ICI) добавляют в концентрации всего 0,002%, однако последний не следует применять при работе с катионообменниками.

6.4. УВЕЛИЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОЙ ВЫСОТЫ КОЛОНКИ

6.4.1. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОЕ СОЕДИНЕНИЕ КОЛОНОК

В разд. 6.3.4 указывалось, что при неполном разделении двух соединений посредством гель-хроматографии можно улучшить степень разделения, увеличив длину колонки. Однако работа с длинными колонками связана с рядом неудобств: их сложно заполнять и элюирование приходится вести с очень малыми скоростями, особенно если колонка заполнена мягкими гелями. Однако последовательно соединяя две и большее число колонок, можно добиться увеличения эффективной длины колонки и тем самым лучшего разрешения. С этой целью выбирают несколько одинаковых плунжерных колонок, каждую из которых заполняют гелем независимо от других. После заполнения колонок гелем и фиксации заполняющих слоев плунжерами вывод из одной колонки соединяют с вводом в другую возможно более короткой и тонкой трубкой. Хроматографирование на такой составной колонке ведут восходящим методом (разд. 6.3.6). В такой составной колонке допустимы бóльшие скорости потока, чем в одной колонке, высота которой равна сумме высот соединенных колонок.

6.4.2. РЕЦИРКУЛЯЦИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Оригинальным решением проблемы увеличения эффективной высоты колонки является описанный Поратом и Бенничем [43] метод, названный рециркуляционной хроматографией. Отличается этот метод от обычно применяемого тем, что выходящий из колонки элюат вновь подается на колонку и проходит через нее второй (и большее число), раз, в результате качество фракционирования смеси улучшается. На рис. 6.9 показана схема установки для рециркуляционной хроматографии. В эту установку входят колонка с двумя плунжерами, перистальтический насос, детектор с самописцем, регистрирующим поглощение в УФ-области, и четырехходовой кран. Необходимо, чтобы объем системы от вывода из колонки до ввода в нее был возможно меньше и чтобы в насосе не происходило смешения жидкости.

Этот метод имеет следующие основные преимущества: в течение каждого цикла можно вести наблюдение за ходом разделения и по достижении удовлетворительного разделения про-

цесс можно прервать. Можно полностью вывести из системы отделенные компоненты, в частности не представляющие интереса или каким-то образом ухудшающие разделение, и провести разделение оставшейся смеси. Для этого метода можно использовать колонки средних размеров и таким образом умень-

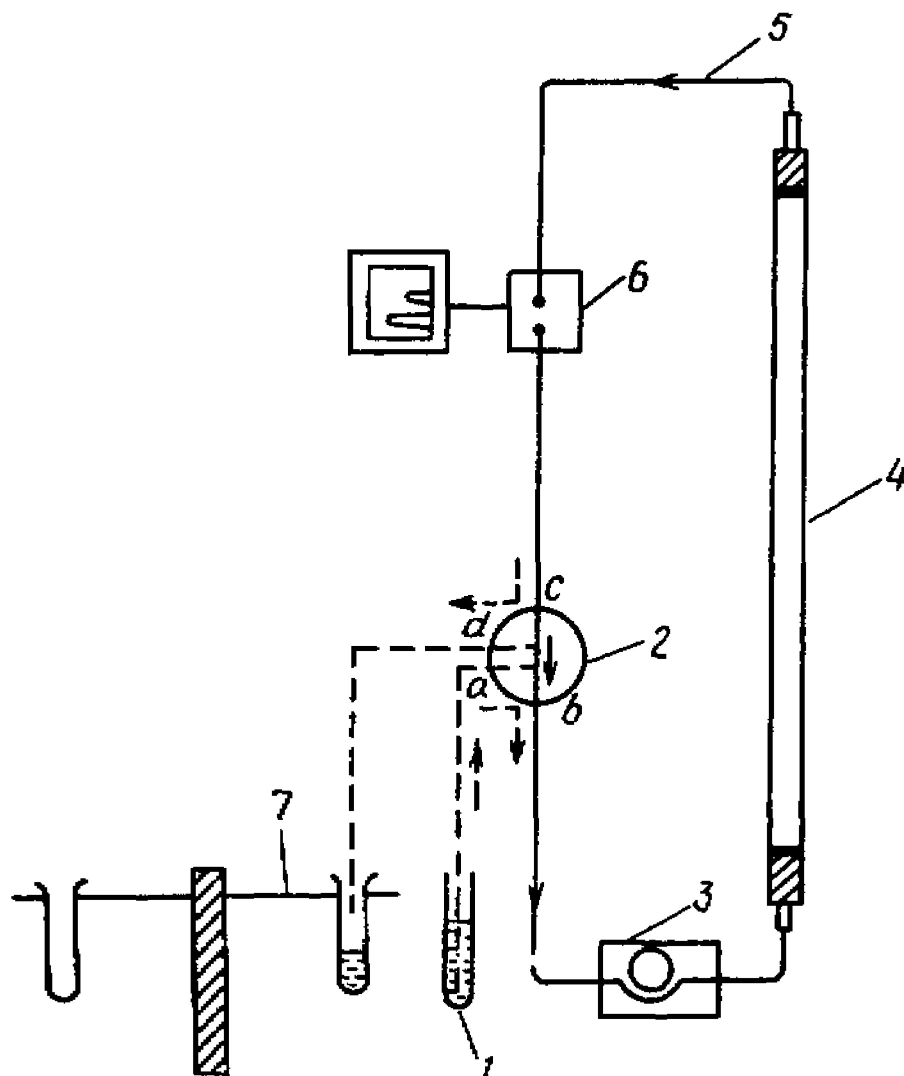


Рис. 6.9. Схема рециркуляционной хроматографии.

1 — сосуд для ввода пробы; *2* — двухпозиционный четырехходовой рециркуляционный кран, позволяющий переходить от потока в открытой системе (····· соединения *ab*, *cd*) — ввод пробы и отбор элюата — к потоку в закрытой системе (——— соединение *cb*) и наоборот; *3* — перистальтический насос; *4* — хроматографическая колонка с двумя плунжерами и заполняющим слоем; *5* — полиэтиленовые или поливинилхлоридные трубки; *6* — УФ-спектрофотометр с самописцем; *7* — сборник фракций.

шить количество геля, заполняющего колонку, и одновременно увеличить скорость потока.

6.4.3. ПРЕРЫВАЮЩАЯСЯ РЕЦИРКУЛЯЦИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Прерывающуюся рециркуляционную хроматографию первым описал и применил Моравек [34]. Эта модификация метода, впервые описанная в [43], предусматривает замену замкнутой рециркуляционной системы на открытую систему, т. е. проводится отбор фракций, поступающих из колонки. После их анализа по УФ-поглощению, ферментационной активности, радиоактивности и т. п. те фракции, которые надо рециркулировать, опять вводят в колонку в определенные моменты хроматографического процесса. Подают их в колонку в том порядке, в

каком они выходят из колонки, и проводят весь цикл разделения. Разделение описанным методом можно проводить на обычной колонке без дополнительного оснащения, дополнительно необходим только сборник фракций. Выходящие из колонки фракции можно анализировать более подробно, чем при обыч-

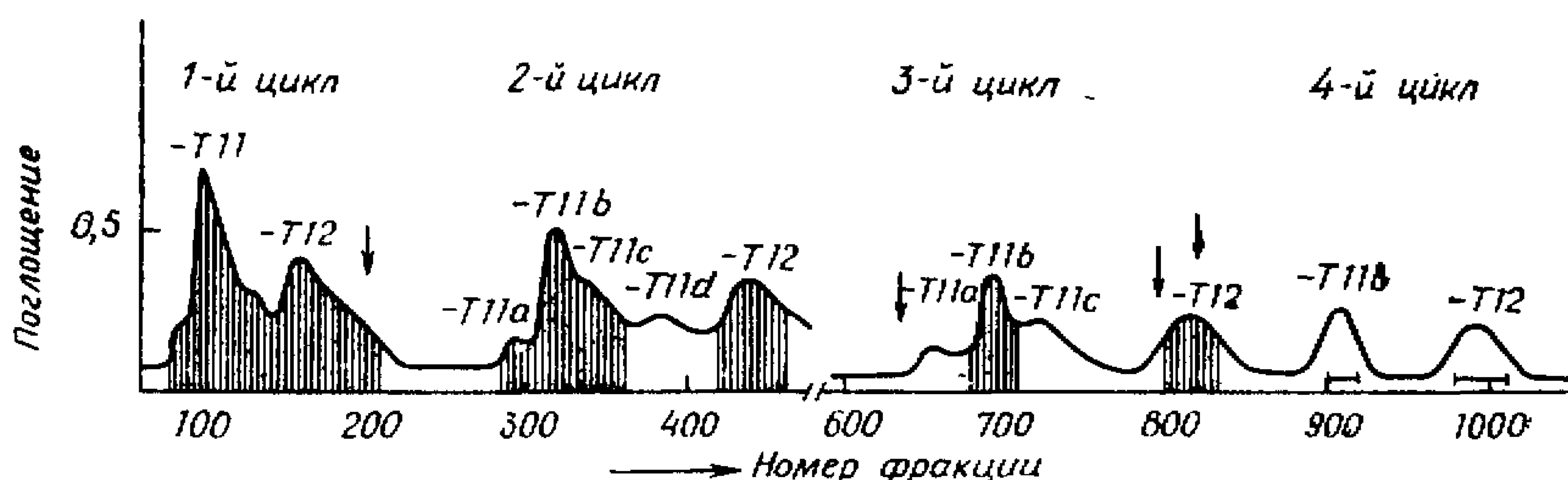


Рис. 6.10. **Прерывающаяся рециркуляционная хроматография трипсинового гидролизата аминометилированного фрагмента пепсина СВ 2 [34].**

Колонка 260×10 см; гель — сефадекс G-100, приведенный в равновесие с элюентом; элюент — раствор ацетата аммония (0,3М) и мочевины (8М), pH 5,0; проба — 2,5 г образца в 500 мл указанного раствора; объем отбираемых фракций 100 мл (с интервалом 1 ч); обнаружение — поглощение при 280 нм. Заштрихованные площади показывают ход прерывающейся рециркуляции. Стрелками указан повторный ввод фракций для рециркуляционной хроматографии (не отмечен стрелкой повторный ввод зоны T11a — T11c в третьем цикле, его проводили при отборе фракции № 560, не показанной на графике). Стрелка при фракции № 637 показывает начало повторного ввода фракций, соответствующих зоне T12.

ной рециркуляционной хроматографии, и в одной колонке возможна рециркуляция соединений с K_D от 0 до 1 (см. рис. 6.10). Основной недостаток метода — увеличение длительности разделения и несколько бо́льшая трудоемкость.

6.5. ОБРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ

С целью наглядной оценки результатов гель-хроматографии строят кривую зависимости концентрации соединения (или другого зависящего от концентрации параметра, чаще всего коэффициента поглощения) от номера фракции. Вид этой кривой всегда зависит от геометрии и размеров слоя и объема отдельных фракций. Поэтому такие характеристики обязательно следует указывать. Если умножить число фракций одинакового объема на объем одной из них, то получится величина V_e (список обозначений см. выше, в разд. 6.1.2).

Чтобы охарактеризовать ход разделения веществ независимо от размеров колонки, используют параметр V_e/V_0 — относительный объем элюирования, который легко рассчитать. От колонки к колонке он может меняться в узких пределах, так как величина V_0, а следовательно, и V_e/V_0 зависят от характера заполнения колонки. Если при заполнении прилагают повышенное давление или каким-либо другим способом сжимают слой

геля, то величина свободного объема V_0 уменьшается в определенной степени и соответственно увеличивается относительный объем элюирования. Однако это изменение не имеет большого практического значения.

Обратной величиной относительного объема элюирования является константа удерживания $R = V_0/V_e$. Ее используют для сравнения относительных скоростей, которые характеризуют поведение соединений при разделении в тонком слое. Отношение V_e/V_t очень легко рассчитать. V_t определяют посредством калибровки колонки до ее заполнения. Это отношение также можно использовать для характеристики поведения соединений без учета геометрии колонки.

Гель-хроматографию следует рассматривать как один из видов распределительной хроматографии. Исходя из основного уравнения для распределительной хроматографии

$$V_e = V_0 + K_D V_s \qquad (6.6)$$

(где K_D — константа распределения между неподвижной и подвижной фазами, V_s — объем неподвижной фазы), можно использовать рассчитанную по этому уравнению величину K_D в качестве характеристики данного соединения. Применительно к гель-хроматографии уравнение (6.6) (см. [18]) можно видоизменить:

$$V_e = V_0 + K_D V_i. \qquad (6.7)$$

Из полученного выражения следует, что

$$K_D = (V_e - V_0)/V_i. \qquad (6.8)$$

Величина K_D служит хроматографической характеристикой растворенных веществ, особенно на первых стадиях развития гель-хроматографии. Поскольку определить V_i можно лишь приближенно, Лоран и Килландер [30], основываясь на таких же теоретических соображениях, ввели величину K_{av}:

$$K_{av} = (V_e - V_0)/V_x; \qquad (6.9)$$

подставляя вместо V_x его значения из формулы (6.1), получили следующее соотношение:

$$K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0),$$

где K_{av} определяется как доля объема геля, доступная для растворенного вещества. В настоящее время чаще пользуются именно величиной K_{av}. Она не зависит от степени сжатия геля, и все объемы, которые необходимы знать, чтобы рассчитать эту величину, легко измерить.

Различие между K_D и K_{av} определяется тем, что принимают за неподвижную фазу. При определении K_{av} неподвижной фазой считают весь объем, занимаемый гелем, а при определении K_D из объема геля вычитают объем матрицы.

6.6. ПРИМЕНЕНИЕ ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИИ

Как уже говорилось в разд. 6.1, за последние два десятилетия расширилась область применения гель-хроматографии в биохимии (в частности, этим методом стали разделять водорастворимые соединения), а также в синтетической органической химии и химии полимеров. Подробно описать все области применения гель-хроматографии в данной главе практически невозможно. Из тысяч статей, посвященных этой теме, мы выберем лишь несколько и опишем только некоторые наиболее интересные примеры. Более подробную информацию можно найти в периодически публикуемых фирмой Pharmacia Fine Chemicals, Упсала (Швеция) библиографических списках (Literature References) в библиографическом разделе Journal of Chromatography (см. [15]), в руководствах [12, 17], о которых уже говорилось выше, и в недавно опубликованной монографии, посвященной жидкостной колоночной хроматографии [14].

6.6.1. ОБЕССОЛИВАНИЕ И ГРУППОВОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ

В гель-хроматографии групповым разделением называют такой процесс, в ходе которого высокомолекулярные соединения хорошо отделяются в виде одной группы от другой группы — низкомолекулярных соединений, более тонкое разделение внутри обеих этих групп при этом не требуется. Высокомолекулярные соединения, например белки, нуклеиновые кислоты и т. д., выходят из колонки со свободным объемом элюента (K_{av} равно или близко нулю), а низкомолекулярные соединения прочнее удерживаются (их K_{av} близко к единице). Если низкомолекулярные соединения представляют собой неорганические соли или другие диссоциирующие продукты, то процесс называется высаливанием. Высаливанием часто неправильно называют разделение таких низкомолекулярных соединений, которые не являются солями, например мочевины, сахаров и др.

Интересный пример группового разделения показан на рис. 6.11. Хотя в опыте *Б* объем пробы составлял более $^1/_3$ объема хроматографического слоя, почти 99% гемоглобина удалось освободить от соли. При небольшом объеме пробы (опыт *А*) происходило 10-кратное разбавление белка, а в условиях опыта *Б* при значительном объеме пробы степень разбавления гемоглобина составила всего 1,25. Для группового

разделения высокомолекулярных веществ, например белков, наиболее пригодны сефадексы G-25 и G-50, а также биогель P-6. Для обессоливания соединений с меньшими молекулярными массами, например пептидов, надо подобрать такой гель, чтобы соединение с относительно высокой молекулярной мас-

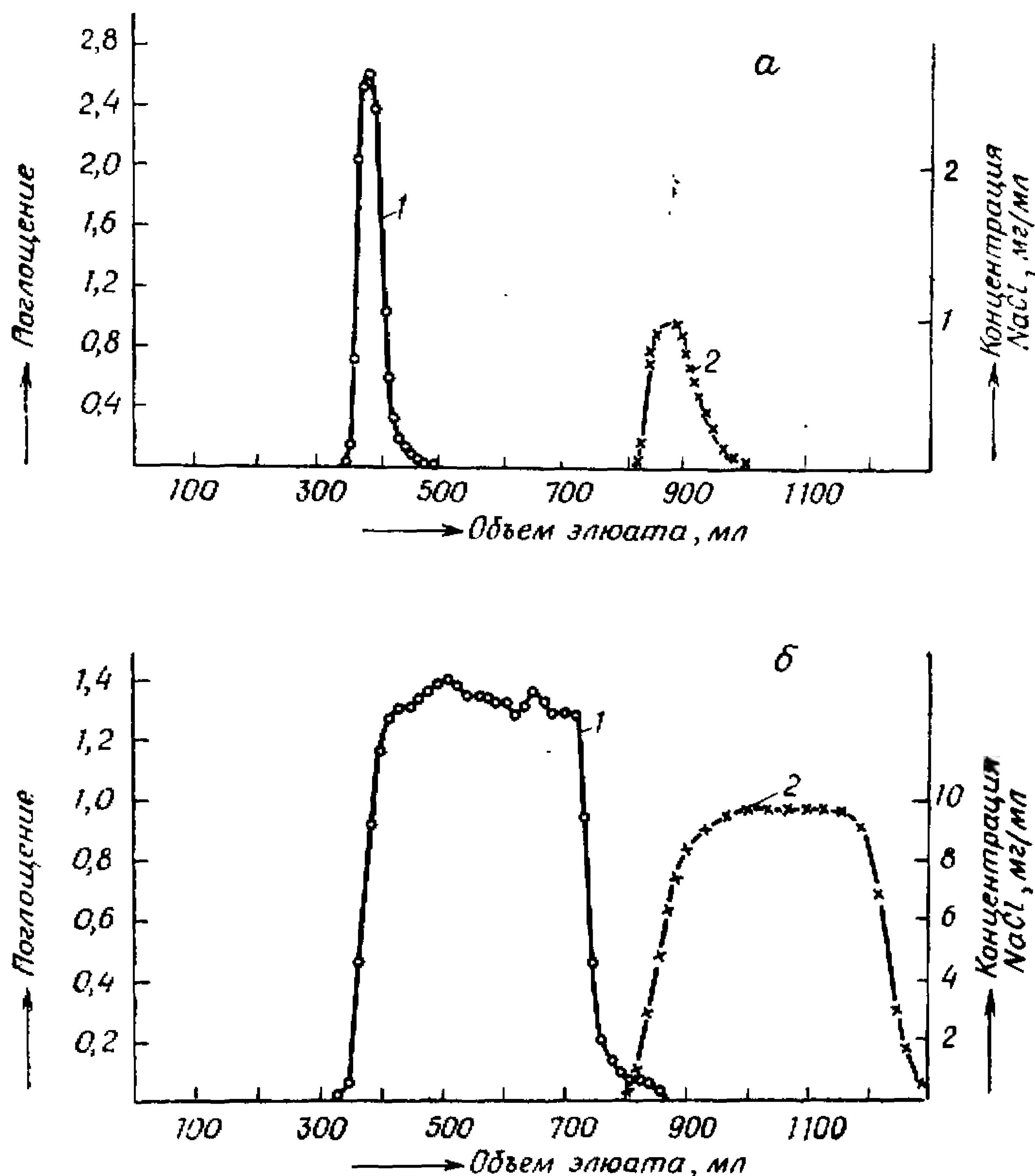


Рис. 6.11. Групповое разделение на сефадексе G-25 гемоглобина (*1*) и хлорида натрия (*2*) [19].

Колонка 4×85 см; гель — сефадекс G-25; общий объем хроматографического слоя 1070 мл, скорость потока 240 мл/ч; проба: *а*) 10 мл раствора, содержащего по 100 мг каждого компонента, *б*) 400 мл раствора, содержащего 400 мг гемоглобина и 4 г хлорида натрия.

сой элюировалось из колонки вместе с объемом элюента, равным свободному объему. В зависимости от размеров молекул для этой цели можно использовать сефадексы G-25, G-15 и G-10 и биогели P-6 и P-2. Рекомендуемые размеры (объемы) проб и размеры колонок указаны в разд. 6.3.4.

Если групповое разделение проводят при элюировании дистиллированной водой, возможны нежелательные эффекты, а именно запаздывание и растекание зон. Поэтому лучше вести

такое разделение в среде летучего электролита. Для соединений, растворимых в области значений pH, соответствующих кислым средам, в качестве среды пригодны уксусная или муравьиная кислота (0,01—0,2 М), а для соединений, растворимых в щелочных средах, — растворы аммиака (0,02 М) или бикарбоната аммония (0,01—0,05М). Групповое разделение используют вместо диализа, например для отделения модифицированных белков от низкомолекулярных продуктов реакции (после S-сульфирования, аминоэтилирования, ацетилирования или после введения радиоактивной метки и т. д.). В настоящее время обессоливание стало настолько обычным методом, что в экспериментальной части статей, как правило, указывают только тип геля и среду и иногда также соотношение объемов пробы и слоя геля.

На гидрофильных гелях можно разделять не только растворы высокомолекулярных соединений, но и суспензии клеточных частиц. Так, Фричова и др. [20] показали, что клетки зобной железы, лимфатических узлов, селезенки и костного мозга мышей можно пропускать через колонки с сефадексом G-25, причем только небольшая доля их обратимо удерживается. На гелях сефадекс G-25, G-50, сефароза 4B и 6B можно полностью отделить эритроциты от их естественной среды; выход эритроцитов при этом почти количественный, а степень гемолиза составляет меньше 0,2% [27].

6.6.2. ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ СМЕСЕЙ

Фракционирование смесей представляет собой более сложный пример применения гель-хроматографии, особенно при небольших различиях в молекулярных массах. Для эффективного разделения необходимо подобрать такой гель, чтобы все разделяемые соединения попали в интервал фракционирования.

На рис. 6.12 показан пример разделения смесей пептидов в длинной колонке с сефадексом G-100. Фрагмент N из сывороточного альбумина человека состоит из трех пептидных цепей, связанных дисульфидными мостиками. После восстановления, карбоксиметилирования и малеилирования эти три пептидные цепи разделяются на колонке с сефадексом G-100 в соответствии с их молекулярными массами. Пептид III-Цис содержит 162 аминокислотных остатка, цепь I-АСп — 88 остатков и цепь II-Ала — 36 аминокислотных остатков.

На рис. 6.13 показано разделение смеси ферментов на большой колонке. Содержащий катепсины C, B_1 и D экстракт бычьей селезенки обрабатывали сульфатом аммония до степени насыщения 0,65, диализовали и разделяли на сефадексе G-150. Полученные пики и соответствующие значения активности фер-

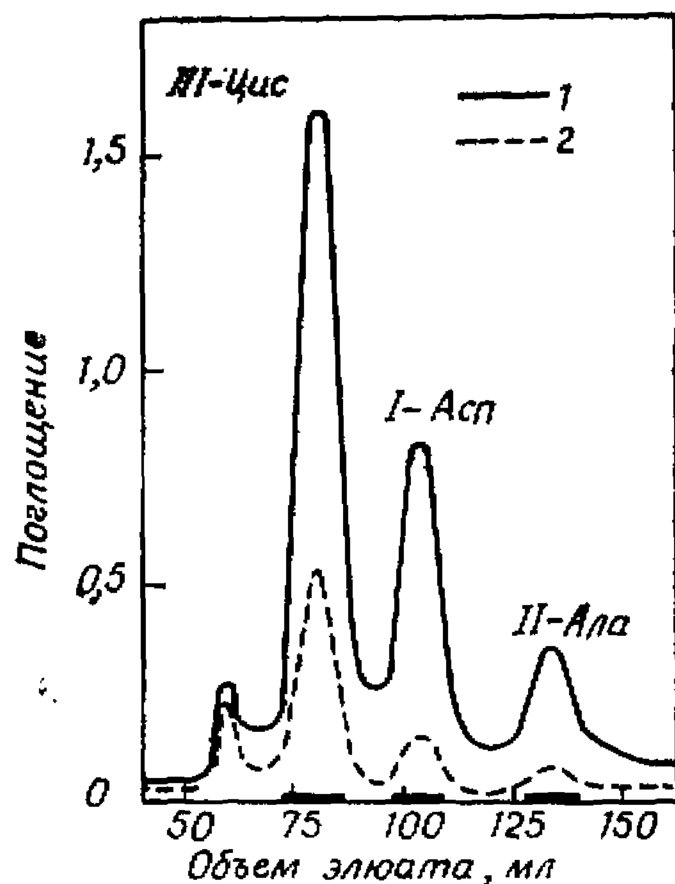


Рис. 6.12. Фракционирование на сефадексе G-100 смеси пептидов, образовавшейся из фрагментов N человеческого сывороточного альбумина после восстановления, карбоксиметилирования и малеилирования [28].

Колонка 1×250 см; элюент — 1M раствор бикарбоната натрия; скорость потока 12 мл/ч; проба — 25 мг смеси пептидов; обнаружение — по поглощению при 256 (1) и 280 нм (2).

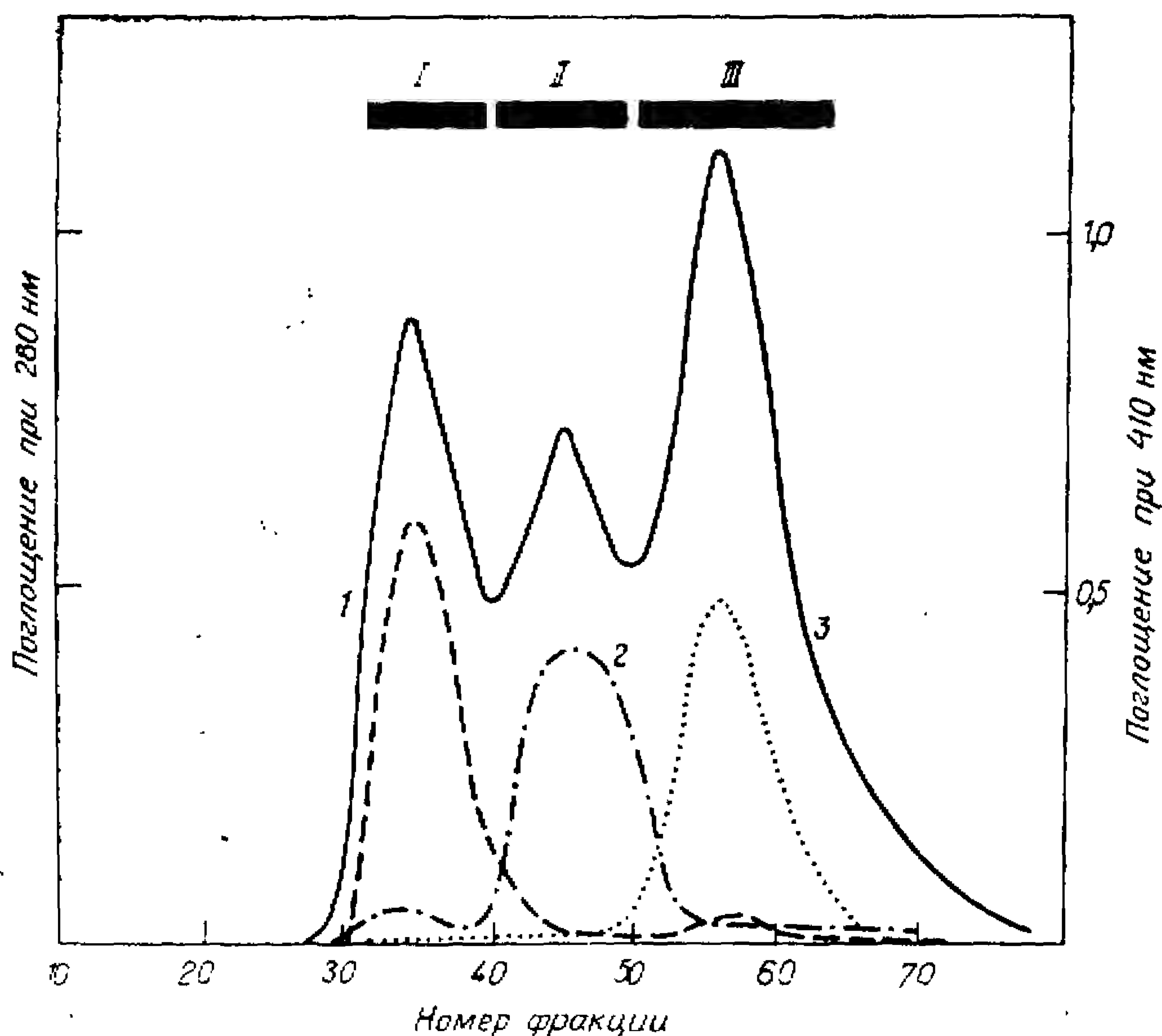


Рис. 6.13. Фракционирование на сефадексе G-150 экстракта бычьей селезенки после осаждения сульфатом аммония [47].

Колонка 10×97 см (V_t=9100 мл); элюент — 0,1M раствор ацетата натрия с добавкой 0,01% азида натрия; восходящее элюирование; скорость потока 200 мл/ч; проба — 55 мл экстракта; отбор фракций каждые 30 мин; температура хроматографирования 5 °С; обнаружение — по поглощению при 280 и 410 нм. Ферментативная активность: 1 — катепсина С (410 нм), 2 — катепсина D (280 нм), 3 — катепсина B_1 (410 нм).

мента относятся к катепсину C (мол. масса 100 000), катепсину D (мол. масса 45 000) и катепсину B_1 (мол. масса 24 000). Эти ферменты были окончательно освобождены от примесей методом аффинной хроматографии [47].

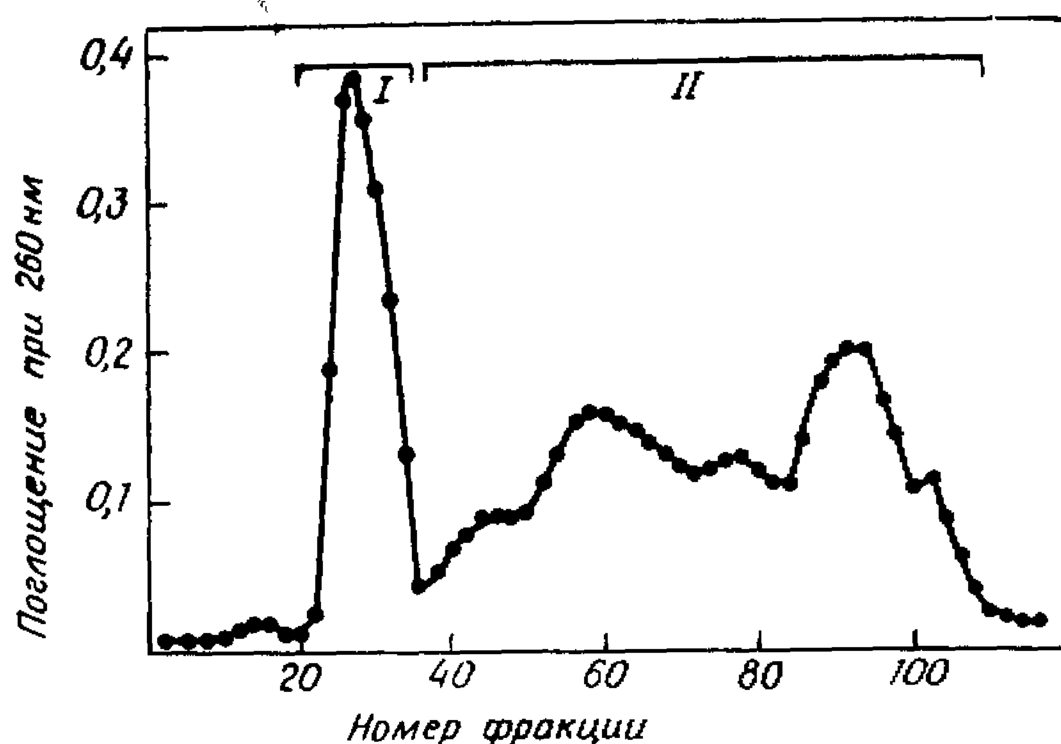


Рис. 6.14. Разделение лизата ядер клеток зобной железы теленка на сефадексе G-150 в 4M растворе гуанидингидрохлорида [41].

Колонка 2×100 см; элюат — 0,05M трисбуфер, pH 8 (0,01M ЭДТА, 0,15M NaCl, 0,015M цитрат натрия); скорость потока 1 мл/см²·ч; проба — 3 мл лизата; объем отбираемых фракций 2 мл. Выделены: *I* — ДНК, *II* — белки.

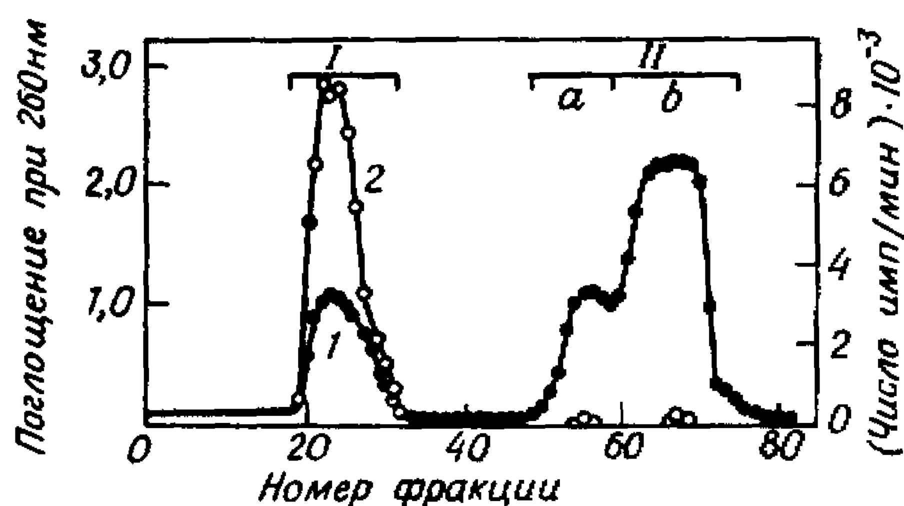


Рис. 6.15. Выделение ДНК из *Bacillus subtilis* на сефарозе 4B [45].

Колонка 3×80 см; элюат — 2 M раствор хлорида натрия в 0,01 M растворе цитрата натрия; скорость потока 24 мл/ч; проба — 15 мл меченного ³H-тимидином лизоцимного лизата из 2 г влажных бактериальных клеток; объем отбираемых фракций 10 мл; обнаружение — по поглощению при 260 нм (*1*) и числу импульсов в минуту (*2*). Выделены: *I* — ДНК, *IIa* — клеточные белки, *IIб* — главным образом лизоцим.

Синтезированным нуклеиновым кислотам сопутствуют белки. Разделить такую смесь довольно сложно, так как отделение белков не должно сопровождаться деполимеризацией нуклеиновых кислот. На рис. 6.14 показаны результаты выделения ДНК из ядер клеток зобной железы теленка [41], проведенного в среде 4M раствора гуанидингидрохлорида, который денатурирует и солюбилизирует белки, не вызывая деструкции высокомолекулярной ДНК.

В работе [45] описано выделение т-ДНК из *Bacillus subtilis* (рис. 6.15) на сефарозе 4В [45], в результате элюирования раствором большой ионной силы авторам работы удалось получить относительно чистую высокомолекулярную ДНК.

Гель-хроматография (ГХ) с органическими растворителями в качестве жидких фаз все шире используется в макромолекулярной и органической химии как аналитический и как препа-

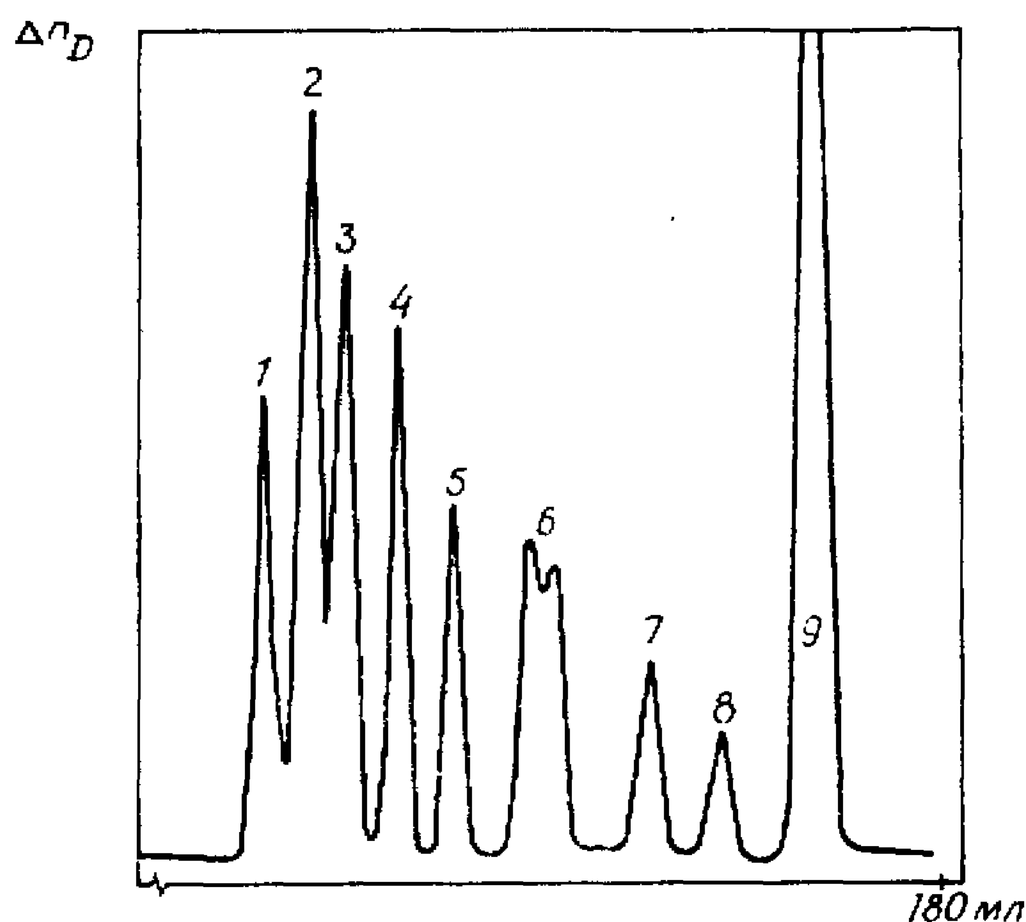
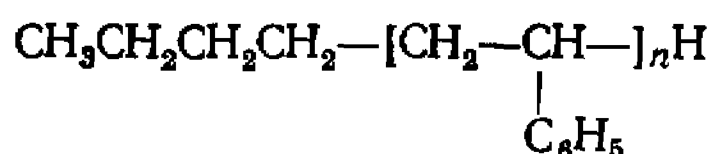


Рис. 6.16. Разделение модельной смеси на биобедсе SX-8 [35].

Колонка 120×0,9 см; сорбент — биобедс SX-8; элюент — бензол; скорость потока 24,5 мл/ч; проба — 41 мг; обнаружение — по изменению коэффициента преломления Δn_D. Выделены: 1 — тристеарин, 2 — трикаприлин, 3 — нонадецилбензол, 4 — тридецилбензол, 5 — нонилбензол, 6 — н-амилбензол+изоамилбензол, 7 — н-бутилбензол, 8 — толуол, 9 — метанол.

ративный метод. Пример аналитического фракционирования смеси на полистирол-дивинилбензольном геле показан на рис. 6.16. На рис. 6.17 приведены хроматограммы, полученные при препаративном разделении олигомеров стирола общей формулы



$$CH_3CH_2CH_2CH_2—[CH_2—\underset{\displaystyle C_6H_5}{\underset{|}{C}H}—]_nH$$

Элюат из основной колонки (рис. 6.17, *а*) непрерывно концентрировали и закачивали во вспомогательную колонку меньшего диаметра. Из вспомогательной колонки (рис. 6.17, *б*) его вновь возвращали в основную колонку. Таким способом удалось выделить фракции отдельных олигомеров со степенью полимеризации от 2 до 14 (рис. 6.17, *в*).

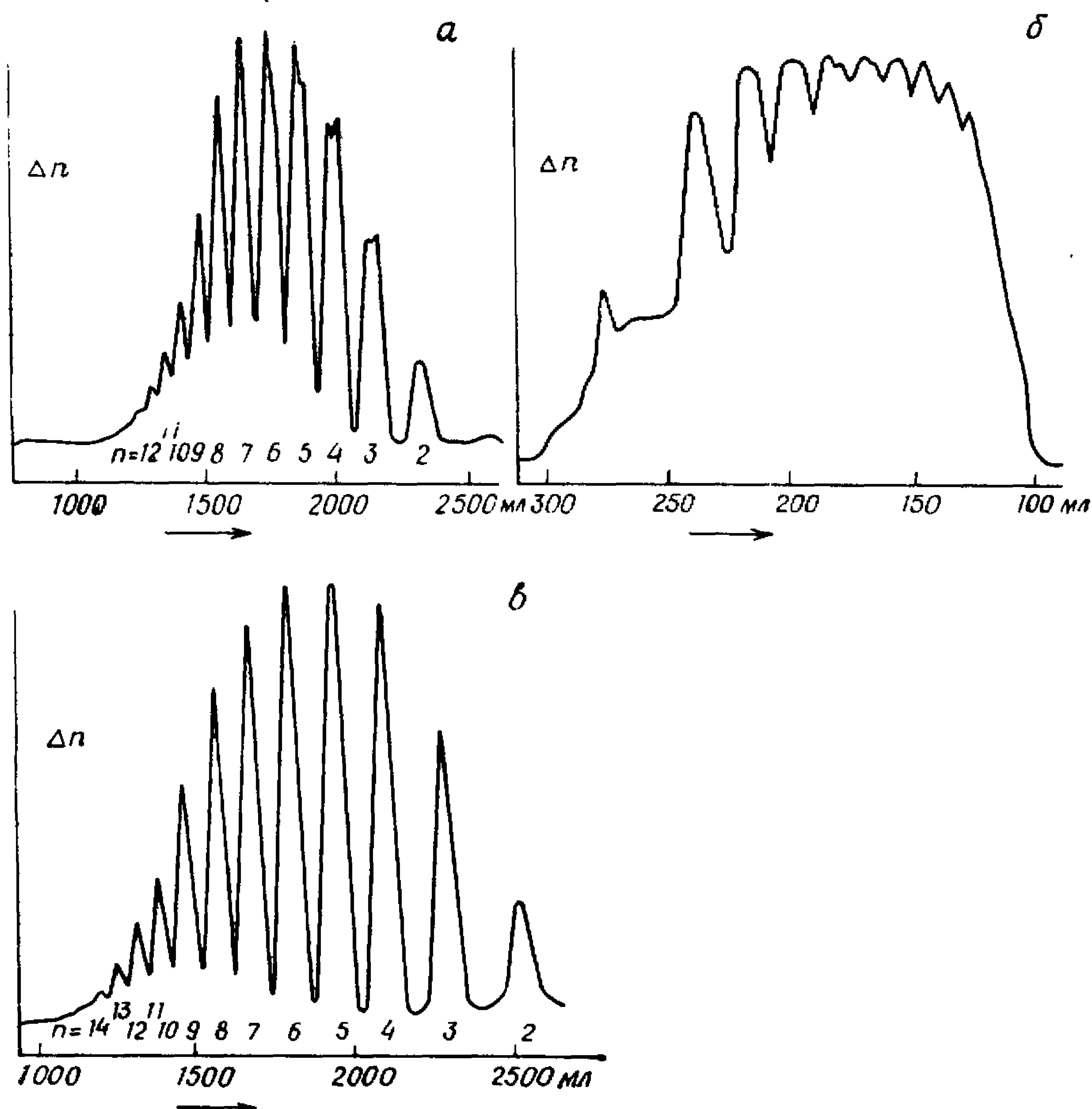


Рис. 6.17. Разделение смеси олигостиролов посредством рециркуляционной хроматографии на полистирольном геле (продукте полимеризации стирола с 2% дивинилбензола) при непрерывном концентрировании элюата [23].

Колонка 200×5 см; растворитель — тетрагидрофуран; скорость потока 200 мл/ч. *а* — после первого пропускания через основную колонку; *б* — после 10-кратного концентрирования и пропускания через вспомогательную колонку размером 200×1,5 см; *в* — после второго разделения в основной колонке (*n* — степень полимеризации).

6.6.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАСС

После того как авторы работы [44] показали, что при разделении на гелях соединения элюируются в порядке убывания их молекулярных масс, были начаты глубокие исследования механизма разделения макромолекулярных природных соединений, в том числе белков, пептидов и полисахаридов, в процессе гель-хроматографии. Основываясь на результатах измерения объемов элюирования полисахаридов типа декстранов при хроматографии на сефадексе, Гранат и Флодин [22] впервые вывели соотношение, согласно которому объем элюирования зависит от логарифма молекулярной массы $V_e/V_t \sim \lg M$. Ряд

других авторов, исходя из различных теоретических моделей гель-хроматографии, вывели соотношения между хроматографическими характеристиками соединений (V_e, K_D или K_{av}) и их молекулярными массами M.

Детерман и Мизель [13] суммировали в виде таблицы все результаты, опубликованные к 1966 г., и на основании анализа

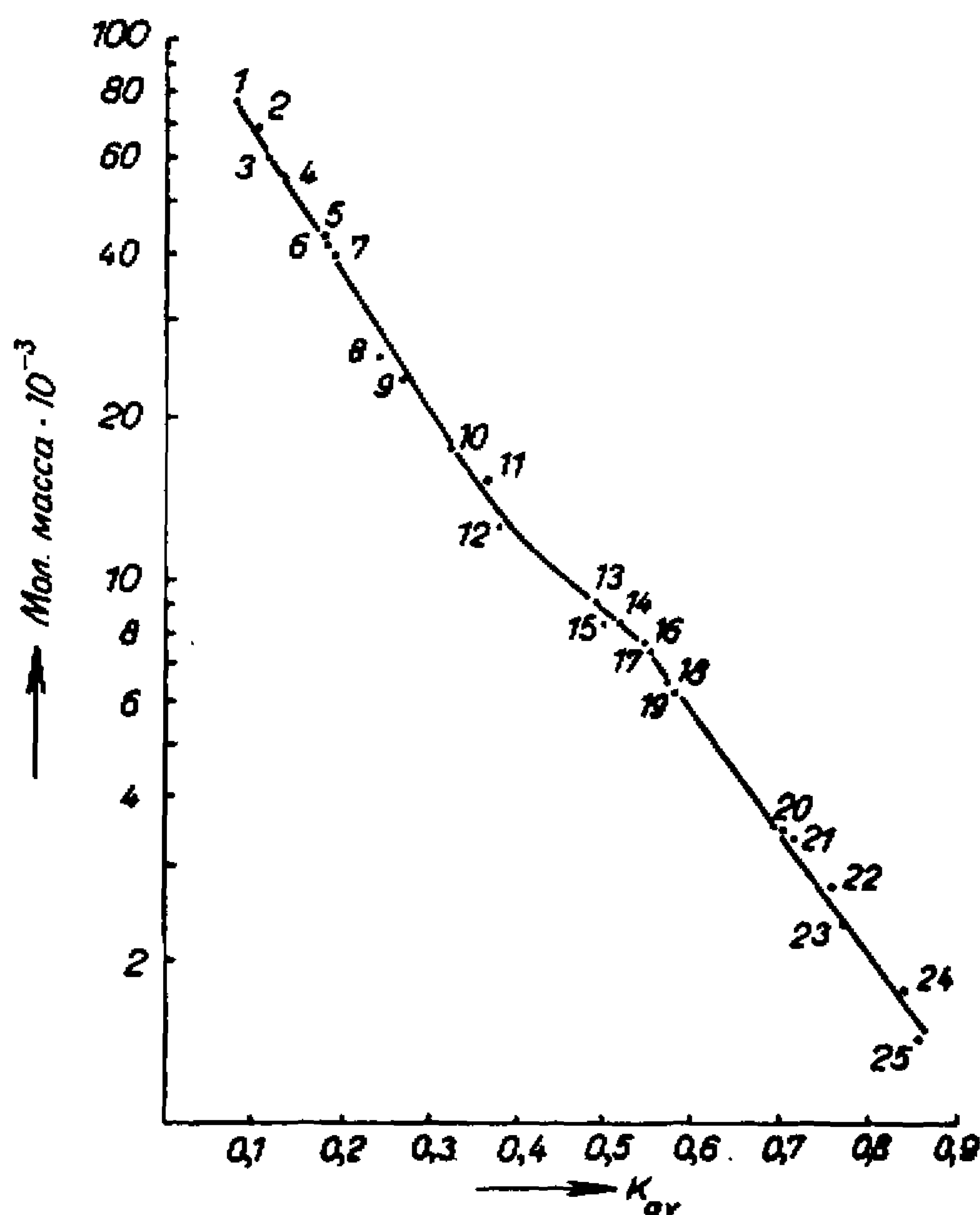


Рис. 6.18. Соотношение между молекулярными массами и величинами K_{av} при гель-хроматографии на сефарозе 6В при элюировании 6М раствором гуанидингидрохлорида [6].

С помощью метода наименьших квадратов получено линейное соотношение (числа соответствуют белкам и пептидам, указанным в табл. 6.14).

результатов собственных измерений вывели эмпирическое соотношение, описывающее поведение высокомолекулярных природных соединений при гель-хроматографии на сефадексе:

$$\log M = A - B(V_e/V_0),$$

где A и B — постоянные величины (в работе [13] даны их числовые значения для конкретных экспериментальных условий). Из числа статей, посвященных этим вопросам, особо упомянем статьи Эндрюса [1—3], в которых (особенно в статье [1]) читатель сможет найти очень ценные экспериментальные детали и практические указания.

Таблица 6.14

Белки и пептиды, использованные как калибровочные соединения при определении молекулярных масс методом гель-хроматографии на сефарозе 6В при элюировании 6М раствором гуанидингидрохлорида[a] [6]

№ п/п	Белок или пептид	Молекулярная масса	K_{av}
1	Трансферин	76 600	0,0758
2	Сывороточный альбумин	68 000	0,1C24
3	Каталаза	60 000	0,1144
4	γ-Глобулин, H-цепь	55 000	0,1343
5	Яичный альбумин	43 000	0,1769
6	Спиртовая дегидрогеназа (из печени)	41 000	0,1795
7	Фосфокиназа креатинина	40 000	0,1875
8	Химотрипсиноген	25 700	0,2380
9	γ-Глобулин, L-цепь	23 500	0,2673
10	Миоглобин	17 200	0,3218
11	Гемоглобин	15 500	0,3630
12	Цитохром *c*	12 300	0,3763
13	Трипсин — CNBr I	9 209	0,4893
14	Трипсиновый ингибитор из фасоли лима	8 400	0,5141
15	Миоглобин — CNBr I	8 181	0,4960
16	Цитохром *c* — CNBr I	7 733	0,5492
17	Трипсин — CNBr II	7 536	0,5518
18	Трипсин — CNBr III	6 533	0,5731
19	Миоглобин — CNBr II	6 235	0,5784
20	Глюкагон	3 480	0,7021
21	Инсулин, B-цепь	3 400	0,7127
22	Цитохром *c* — CNBr II	2 780	0,7579
23	Инсулин, A-цепь	2 340	1,7739
24	Цитохром *c* — CNBr III	1 780	0,8470
25	Бацитрацин	1 411	0,8563

[a] V_0 определяли хроматографированием синего декстрана 2000; V_t определяли, добавляя триптофан к хроматографируемой пробе. Все белки восстанавливали и карбоксиметилировали; —CNBr — фрагменты белка, полученные после расщепления его цианбромидом.

Однако некоторые макромолекулы в процессе гель-хроматографирования ведут себя аномально и не подчиняются указанному соотношению. Такие отклонения наблюдались, в частности, при разделении на сефадексе белков с сильно асимметричными молекулами и некоторых гликопротеинов. Как показал Девидсон [10], эти аномалии можно существенно уменьшить или даже избежать их, если вести хроматографирование в диссоциирующей среде 6М раствора гуанидингидрохлорида на сефарозе 6В.

В табл. 6.14 дан список белков, использованных Брайсом и Кричтоном [6] для калибровки заполненной сефарозой 6В колонки при элюировании 6М раствором гуанидингидрохлорида, а на рис. 6.18 показана кривая зависимости $\lg M$ от K_{av}.

При определении с применением гель-хроматографии ранее неизвестных молекулярных масс следует помнить, что полученные значения молекулярных масс являются лишь приближенными и их необходимо подтвердить с помощью другого независимого метода, например ультрацентрифугирования. Определяя молекулярные массы методом гель-хроматографии, всегда следует проводить калибровку при данных экспериментальных условиях на нескольких соединениях подобного же типа с различными, но заранее известными молекулярными массами.

Самое большое преимущество определения молекулярной массы методом гель-хроматографии — отсутствие необходимости в тщательной очистке исследуемого соединения. Самое сложное в этом случае подобрать приемлемый метод обнаружения (например, метод определения ферментативной активности и т. д.).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Andrews P.*, Biochem. J., **91**, 222 (1964).
2. *Andrews P.*, Biochem. J., **96**, 595 (1965).
3. *Andrews P.*, Nature, **196**, 36 (1962).
4. *Bennich H.*, личное сообщение.
5. Bio-Rad Laboratories, «Chromatography, Electrophoresis, and Membrane Technology», Catalogue Z (1974—1975) Richmond (California), 1974—1975; Catalogue B, 1976.
6. *Bryce C. F. A., Crichton R. R.*, J. Chromatogr., **63**, 267 (1971).
7. *Čoupek J., Křiváková M., Pokorný S.*, J. Polymer Sci. Symp., **42**, 182 (1973).
8. *Craig L. C., King T. P., Stracher A.*, J. Am. Chem. Soc., **79**, 3729 (1957).
9. *Cruft H. J.*, Biochem. Biophys. Acta, **54**, 609 (1961).
10. *Davidson P. F.*, Science, **161**, 906 (1968).
11. *Determan H.*, Angew. Chem., **76**, 615 (1964); Angew. Chem. Intern. Ed., **3**, 608 (1964).
12. *Determan H.*, Gelová Chromatografie, Academia, Prague (1972); Gelchromatographie, Springer Verlag, Berlin, 1967.
13. *Determan H., Michel W.*, J. Chromatogr., **25**, 303 (1966).
14. Жидкостная колоночная хроматография. Пер. с англ./Под ред. З. Дейла, К. Мацека, Я. Янака. — М.: Мир, 1978.

15. *Deyl Z., Rosmus J., Juřicová N., Kopecký J.,* J. Chromatogr. Suppl., 3 (1973).
16. *Fasold H., Gundlach G., Turba F.,* in «Chromatography» (E. Heftman Ed.), Reinhold, New York (1961), p. 406.
17. *Fischer L.,* An Introduction to Gel Chromatography, North-Holland, Amsterdam, 1969.
18. *Flodin P.,* Dextran Gels and Their Application in Gel Filtration, Pharmacia, Uppsala, 1961.
19. *Flodin P.,* J. Chromatogra., 5, 103 (1961).
20. *Fričová V., Hrubá A., Přistoupil T. I.,* J. Chromatogr., **92**, 335 (1974).
21. *Gelotte B.,* J. Chromatogr., **3**, 330 (1960).
22. *Granath K. A., Flodin P.,* Makromol. Chem., **48**, 160 (1961).
23. *Heitz W., Ullner H.,* Makromol. Chem., **120**, 58 (1968).
24. *Hersch C. K.,* Molecular Sieves, Reinhold, New York, 1961.
25. *Hjertén S.,* Biochem. Biophys. Acta, **79**, 393 (1964).
26. *Hjerten S., Mosbach R.,* Anal. Biochem., **3**, 109 (1962).
27. *Kankura T., Kurashina S., Nakao M.,* J. Lab. Clin. Med., **83**, 840 (1974).
28. *Kušnir J., Meloun B.,* Collection Czech. Cehm. Commun., **38**, 143 (1973).
29. *Lathe G. H., Ruthven C. R.,* Biochem. J., **62**, 665 (1956).
30. *Laurent T. C., Killander J.,* J. Chromatogr., **14**, 317 (1964).
31. *Lead J., Sehon A. H.,* Can. J. Chem., **40**, 159 (1962).
32. *Linquist B., Storgards T.,* Nature, **175**, 511 (1955).
33. *Moore J. C.,* J. Polymer. Sci., **A2**, 835 (1964).
34. *Morávek L.,* J. Chromatogr., **59**, 343 (1971).
35. *Mulder J. L., Buytenhuys F. A.,* J. Chromatogr., **51**, 459 (1970).
36. *Pedersen K. O.,* Arch. Biochem. Biophys. Suppl. **1**, 157 (1962).
37. Pharmacia Fine Chemicals, «Separation News» (May 1973).
38. Pharmacia Fine Chemicals, «Sephadex — Gel Filtration in Theory and Practice», Uppsala.
39. Pharmacia Fine Chemicals, «Sephadex LH 20 for Gel Filtration in Organic Solvents, Uppsala.
40. Pharmacia Fine Chemicals, «Sepharose[R] CL for Gel Filtration and Affinity Chromatography», Uppsala (1975).
41. *Pivec L., Štokrová J.,* FEBS Letters, **14**, 157 (1971).
42. *Polson A.,* Biochim. Biophys. Acta, **50**, 565 (1961).
43. *Porath J., Bennich J.,* Arch. Biochim. Biophys., Suppl. **1**, 152 (1962).
44. *Porath J., Flodin P.,* Nature, **183**, 1657 (1959).
45. *Šatava J., Zadražil S., Šormová Z.,* Collection Czech. Chem. Commun., **38**, 2167 (1973).
46. *Steere R. L., Ackers G. K.,* Nature, **194**, 114 (1962).
47. *Tomášek V., Keilová H.,* неопубликованная работа.

СОДЕРЖАНИЕ

Глава 1. Основные типы хроматографии. О. МИКЕШ 11

1.1. Современные методы разделения 11
Краткая история развития современных методов разделения . 13
1.2. Классификация хроматографических методов в соответствии с принципом процесса разделения 21
1.2.1. Адсорбционная хроматография 22
1.2.2. Распределительная хроматография 23
1.2.3. Ионообменная хроматография 24
1.2.4. Гель-хроматография 25
1.2.5. Аффинная хроматография 26
1.2.6. Другие типы хроматографии 27
1.3. Классификация хроматографических методов по способу разделения 28
1.3.1. Фронтальный анализ 28
1.3.2. Вытеснительная хроматография 29
1.3.3. Проявительная (элюентная) хроматография 31
1.3.4. Другие типы классификации по способу разделения . . . 34
1.4. Современная классификация типов хроматографии по характеру фаз, между которыми совершается процесс фракционирования 35
1.4.1. Жидкостная хроматография 35
1.4.2. Газовая хроматография 35
1.5. Другие типы классификации хроматографических методов . . 37
Литература 38

Глава 2. Теория хроматографии. Й. НОВАК 39

2.1. Введение 39
2.2. Общее описание хроматографического процесса 40
2.2.1. Материальный баланс растворенного вещества в хроматографической системе 40
2.2.2. Модель идеального линейного хроматографического процесса 45
2.2.3. Уравнения удерживания 46
2.3. Рациональное описание модели неидеального линейного хроматографического процесса 47
2.3.1. Расширение хроматографической зоны 47
2.3.2. Понятие «теоретическая тарелка» 50
2.4. Течение подвижной фазы 51
2.5. Сорбционное равновесие и константа распределения . . . 52
2.6. Хроматографическое разделение 55
Литература 56

Глава 3. Бумажная хроматография. З. ПРОХАЗКА, К. ШЕБЕСТА, В. ТОМАШЕК 58

3.1. Введение 58
3.1.1. Хроматографическая бумага 59
3.1.2. Аппаратура для бумажной хроматографии 62
Хроматографические камеры и вспомогательные приспособления 62
Приспособления для сушки хроматограмм 66
Пипетки для нанесения проб 67
Аппаратура для обнаружения 68

Измерение значения R_f 69
Аппаратура для элюирования пятен 70
3.1.3. Выбор растворителей (подвижной фазы) 71
3.1.4. Определение величин R_f и R_M, их измерение и применение 78
3.2. Техника работы 87
3.2.1. Приготовление пробы 87
3.2.2. Нанесение пробы 88
3.2.3. Обращение с хроматограммами и элюирование их . . . 89
3.2.4. Сушка 94
3.2.5. Обнаружение 94
3.2.6. Экстрагирование хроматографических зон 96
3.2.7. Хранение хроматограмм и оформление полученных данных 97
3.3. Препаративная бумажная хроматография 97
3.4. Количественная бумажная хроматография 98
3.5. Бумажная хроматография органических кислородсодержащих соединений 100
3.5.1. Спирты 101
3.5.2. Сахара 103
3.5.3. Альдегиды и кетоны 109
3.5.4. Кислоты 110
3.5.5. Фенолы, флавоноиды, кумарины 114
3.5.6. Стероиды и терпеноиды 117
3.5.7. Другие кислородсодержащие соединения 119
3.6. Бумажная хроматография органических азотсодержащих соединений 121
3.6.1. Бумажная хроматография аминокислот и пептидов. В. Томашек 121
Обнаружение аминокислот и пептидов 125
Специфические способы обнаружения 125
3.6.2. Компоненты нуклеиновых кислот. К. Шебеста 127
3.6.3. Алкалоиды 128
3.6.4. Индолы 130
3.6.5. Амины 133
3.6.6. Нитросоединения 134
3.7. Бумажная хроматография соединений, содержащих другие гетероатомы 135
3.7.1. Серусодержащие соединения 135
3.7.2. Органические соединения фосфора 136
3.8. Витамины 137
3.9. Антибиотики 139
3.10. Другие органические соединения 141
3.11. Бумажная хроматография неорганических соединений. М. Гейтманек 142
3.11.1. Примеры разделения и обнаружения катионов 143
Щелочные металлы 143
Щелочноземельные металлы 144
Никель, кобальт, медь 144
Ниобий и тантал 145
Редкоземельные металлы 145
Торий, уран, лантан 145
Выделение одного или двух элементов из смеси 146
3.11.2. Примеры разделения и обнаружения анионов 146
Галогениды 146
Хлорид, хлорит, хлорат и перхлорат 146
Фосфаты 146
3.12. Колонки с целлюлозой 147
Литература 148

Глава 4. Адсорбционная колоночная хроматография. О. МОТЛ, Л. НОВОТНЫЙ . . . 152

4.1. Введение . . . 152
4.2. Адсорбенты . . . 153
4.2.1. Общие свойства адсорбентов . . . 153
4.2.2. Силикагель . . . 160
Приготовление макропористого силикагеля с применением катионообменника [54] . . . 162
Деление адсорбента на фракции по размерам частиц . . . 163
Приготовление силикагеля, пропитанного нитратом серебра . . . 164
Регенерация силикагеля . . . 165
4.2.3. Оксид алюминия . . . 165
Определение активности оксида алюминия методом ТСХ . . . 167
Пропитка оксида алюминия нитратом серебра . . . 169
4.2.4. Силикат магния флоризил . . . 169
4.2.5. Оксид магния . . . 169
4.2.6. Древесный уголь . . . 170
4.2.7. Полиамиды . . . 171
Определение сорбционной активности полиамидного порошка . . . 173
Один из способов получения дешевого адсорбента с нужным размером частиц [77] . . . 174
4.2.8. Полистирольные адсорбенты . . . 175
Подготовка амберлита XAD-2 (0,3—1 мм) . . . 176
4.2.9. Адсорбенты для жидкостной хроматографии высокого давления (ЖХВД) . . . 177
4.2.10. Реакции на адсорбентах . . . 182
4.3. Подвижная фаза . . . 184
4.4. Техника хроматографирования . . . 188
4.4.1. Выбор метода хроматографии . . . 188
4.4.2. Колонки и заполнение их адсорбентом . . . 189
Техника заполнения колонок . . . 190
4.4.3. Методика подбора элюирующей системы . . . 193
4.4.4. Методика хроматографии и оценка результатов . . . 195
Классическая колоночная хроматография . . . 195
Жидкостная хроматография высокого давления (высокоэффективная жидкостная хроматография) . . . 197
4.5. Примеры разделения методом адсорбционной хроматографии ряда органических соединений . . . 200
4.5.1. Разделение сесквитерпенов, содержащихся в корневищах *Senecio nemorensis fuchsii* [53] . . . 200
4.5.2. Экстракция и хроматографическое разделение в инертной атмосфере . . . 201
4.5.3. Хроматография в колонке, заполненной ионообменником в Ag^+-форме . . . 205
Приготовление насадки . . . 207
4.5.4. Разделение гликозидов каротиноидов на оксиде магния . . . 208
4.5.5. Разделение корриноидов методом проявительной хроматографии на неполярном адсорбенте амберлит XAD-2 . . . 209
4.5.6. Жидко-твердофазная хроматография высокого давления на классических и поверхностно-пористых сорбентах . . . 210
4.5.7. Препаративная жидкостная хроматография высокого давления . . . 216
4.5.8. Жидкостная хроматография высокого давления с использованием химически связанных неподвижных фаз . . . 217
Литература . . . 219

Глава 5. Ионообменная хроматография. О. МИКЕШ, К. ШЕБЕСТА 222
5.1. Введение 222
5.1.1. Что такое ионообменники? 222
5.1.2. Классификация ионообменников по их природе и по химическому составу матрицы 223
5.1.3. Классификация ионообменников по ионогенным группам . . 223
5.1.4. Классификация по форме и состоянию 226
5.2. Структура ионитов. Я. Штамберг 229
5.2.1. Неорганические иониты 229
5.2.2. Ионообменные смолы 231
5.2.3. Иониты на основе целлюлозы 234
5.2.4. Иониты на основе производных полидекстрана и агарозы 235
5.2.5. Ионообменные материалы других типов 236
5.2.6. Физическая структура гранулированных ионитов 236
5.3. Природа сорбционных процессов 238
5.3.1. Ионный обмен 238
5.3.2. Процессы, сопровождающие ионный обмен 239
5.3.3. Сорбция амфотерных ионов. О. Микеш 241
5.4. Основы ионообменной хроматографии. Я. Штамберг 242
5.4.1. Хроматография низкомолекулярных соединений 242
5.4.2. Хроматография белков. О. Микеш 244
5.5. Основные характеристики ионитов. Я. Штамберг 245
5.5.1. Обменная емкость 246
5.5.2. Крнвые титрования 247
5.5.3. Плотность и набухаемость 249
5.5.4. Размер и форма частиц 250
5.6. Подготовка ионитов к хроматографическому процессу, их регенернрование и хранение 251
5.6.1. Выбор ионита 251
5.6.2. Декантация и набухание 267
5.6.3. Фракцнонирование частиц по размерам в лаборатории . . 268
5.6.4. Предварительная обработка ионита 268
5.6.5. Выбор буферов и буферирование ионитов 270
5.6.6. Регенерация и хранение ионитов 272
5.7. Хроматография 273
5.7.1. Хроматографические колонки и их емкость 273
5.7.2. Заполнение колонки ионитом и контроль за приведением ионита к равновесию 275
5.7.3. Ввод пробы в колонку 277
5.7.4. Методы элюирования и скорость элюирования 278
5.7.5. Размер отбираемых фракций и анализ фракций 280
5.7.6. Пересчет параметров при использовании разных колонок 281
5.8. Примеры использования ионитов для разделения смесей неорганнческих веществ. М. Гейтманек 282
5.8.1. Нехроматографические процессы 282
Умягчение воды 283
Деминерализация воды 283
Определение полной концентрации солей 284
Исключение мешающих ионов 285
Накопление следовых ионов 286
5.8.2. Хроматографня катионов 286
Щелочные металлы 287
Ионы щелочноземельных металлов и другие катионы . . . 287
5.8.3. Хроматография анионов 288
5.8.4. Ионный обмен с участием растворов комплексных солей при применении смесей растворителей 290

Разделение переходных металлов 290
Разделение мышьяка, сурьмы и олова 292
Разделение многозарядных ионов 293
5.9. Примеры разделений органических соединений. Я. Штамберг 294
5.9.1. Хроматография на сильнодиссоциированных ионитах . . . 294
5.9.2. Хроматография на ионитах модифицированной структуры 299
5.9.3. Хроматография на полимерных сорбентах 303
5.10. Применение ионитов в биохимии. О. Микеш, К. Шебеста . . 304
5.10.1. Аминокислоты 305
5.10.2. Пептиды 312
5.10.3. Белки 316
5.10.4. Фрагменты оболочек клеток микробов 321
5.10.5. Антибиотики 322
5.10.6. Витамины 325
5.10.7. Основания, нуклеозиды, нуклеотиды и нуклеиновые кислоты 327
Литература 333

Глава 6. Гель-хроматография. В. ТОМАШЕК 339

6.1. Введение 339
6.1.1. Принципы гель-хроматографии 340
6.1.2. Определения и основные понятия 341
6.2. Гели для хроматографии 347
6.2.1. Требования, предъявляемые к гелям 347
6.2.2. Декстрановые гели 349
Сефадекс G 349
Сефадекс LH-20 351
6.2.3. Полиакриламидные гели 351
6.2.4. Оксиалкилметакрилатные гели 352
6.2.5. Гели агарозы 353
6.2.6. Другие гели 356
Ультрагели 356
Полистирольные гели 356
Поливинилацетатные и полиэтиленгликолевые гели 360
Пористый силикагель и пористое стекло 360
6.3. Методика гель-хроматографии 363
6.3.1. Оборудование, колонки, соединительные элементы и способы регулирования скорости потока 363
6.3.2. Выбор геля 366
6.3.3. Подготовительные работы 367
Приготовление геля 367
Заполнение колонки 368
Проверка правильности заполнения колонки и определение V_0 369
6.3.4. Размеры колонок, величина пробы и скорость потока . . . 370
6.3.5. Ввод пробы 372
6.3.6. Восходящая гель-хроматография 373
6.3.7. Регенерация хроматографических слоев 374
6.3.8. Хранение гелей 375
6.3.9. Предохранение от микробной инфекции 376
6.4. Увеличение эффективной высоты колонки 377
6.4.1. Последовательное соединение колонок 377
6.4.2. Рециркуляционная хроматография 377
6.4.3. Прерывающаяся рециркуляционная хроматография . . . 378
6.5. Обработка экспериментальных данных 379
6.6. Применение гель-хроматографии 381
6.6.1. Обессоливание и групповое разделение 381
6.6.2. Фракционирование смесей 383
6.6.3. Определение молекулярных масс 387
Литература 390

УВАЖАЕМЫЙ ЧИТАТЕЛЬ!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу: 129820, Москва, И-110, ГСП, 1-й Рижский пер., д. 2.

О. Микеш

ЛАБОРАТОРНОЕ РУКОВОДСТВО
ПО ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМ
И СМЕЖНЫМ МЕТОДАМ.

Часть 1

Научный редактор Р. И. Краснова
Мл. научный редактор Н. Н. Устякова
Художник Ю. С. Урманчиев
Художественный редактор М. Н. Кузьмина
Технический редактор Т. А. Максимова
Корректор К. Л. Водяницкая

ИБ № 3147

Сдано в набор 27.01.82. Подписано к печати 13.05.82.
Формат 60×90¹/₁₆. Бумага кн.-журнальная.
Гарнитура латинская. Печать высокая. Объем 12,50 бум. л.
Усл. печ. л. 25,00. Усл. кр.-отт. 25.00. Уч.-изд. л. 25,69.
Изд. № 3/1450. Тираж 9300 экз. Зак. 2293. Цена 1 р. 60 к.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР». Москва, 1-й Рижский пер., 2.

Московская типография № 11 Союзполиграфпрома
при Государственном комитете СССР по делам издательств,
полиграфии и книжной торговли. Москва, 113105,
Нагатинская ул., д. 1.

Список книг издательства «Мир», имеющихся в продаже в опорных пунктах издательства в Ленинграде (191040 Ленинград, Пушкинская ул., 2, магазин № 5 «Техническая книга»)

Бландел Т., Дженсон Л. Кристаллография белка. 1979. 6 р.
Вундерлих Б. Физика макромолекул. Т. 2. 1979. 4 р. 70 к.
Гудман М., Морхоуз Ф. Органические молекулы в действии. 1977. 1 р. 39 к.
Заградник Р., Полак Р. Основы квантовой химии. 1979. 2 р. 30 к.
Идзуми И., Тай А. Стерео-дифференцирующие реакции. 1979. 3 р. 60 к.
Исаакс Н. Практикум по физической органической химии. 1972. 1 р. 52 к.
Карбониевые ионы. Участие соседних групп и проблема неклассической стабилизации. 1976. 4 р.
Катализ. Физикохимия гетерогенного катализа. 1967. 1 р. 19 к.
Крейдок С., Хинчклиф А. Матричная изоляция. 1978. 1 р. 20 к.
Криохимия. Под ред. М. Московица, Г. Озина. 1979. 5 р. 20 к.
Леман Т., Бёрси М. Спектрометрия ионного циклотронного резонанса. 1980. 2 р.
Метод спиновых меток. Теория и применение. Под ред. Л. Берлинера. 1979. 6 р. 20 к.
Польские химические олимпиады. (Серия «Задачи и олимпиады».) 1980. 1 р. 40 к.
Слейбо У., Персонс Т. Общая химия. 1979. 5 р. 20 к.
Сталл Д., Вестрам Э., Зинке Г. Химическая термодинамика органических соединений. 1971. 4 р. 56 к.
Томпсон Дж. Электроны в жидком аммиаке. 1979. 3 р. 10 к.
Химия цеолитов и катализ на цеолитах. В 2-х томах. Под ред. Ж. Рабо. 1980. Компл. 10 р. 10 к.
Цюлике Л. Квантовая химия. Т. 1. Основы и общие методы. 1976. 2 р. 37 к.
Эткинс П. Физическая химия. В 2-х томах. 1980. 5 р. 80 к.